

Potensi Probiotik Bakteri Asam Laktat Asal Madu dari Tiga Jenis Lebah yang Berbeda

[Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria from Honey of Three Different Type Honeybees]

Iffa Illiyya Fatma¹⁾, Lilis Nuraida^{2,3)*}, dan Didah Nur Faridah²⁾

¹⁾ Program Studi Ilmu Pangan, Sekolah Pascasarjana, IPB University, Bogor, Indonesia

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Bogor, Indonesia

³⁾ South-East Asia Food & Agricultural Science and Technology (SEAFST) Center, IPB University, Bogor, Indonesia

Diterima 13 Juli 2022 / Disetujui 15 Desember 2022

ABSTRACT

Certain strains of Lactic acid bacteria (LAB) especially from the genus of *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* have been recognized to have health beneficial effect as probiotics. Honey has been known to have health beneficial effects and contains lactic acid bacteria. However, information pertaining the characteristics of LAB from honey is still limited. The present research aimed to isolate LAB from different types of honey and to evaluate their potency as probiotic. The LAB were enumerated and isolated from honey produced by three different honeybees: *Apis cerana*, *Heterotrigona itama*, and *Trigona laeviceps*. The results showed the count of LAB in three different honey ranged from 5.0×10^1 to 2.3×10^7 CFU/mL and affected by different time of sampling. The highest of average LAB count was found in honey of *Heterotrigona itama*. There were 48 Gram positive catalase-negative bacterial isolates obtained from the three different honey types. Twelve isolates were selected based on their survival in bile salt. The twelve selected isolates were capable of growing in MRSB pH 2.5, and MRSB containing 0.3% bile salt. They also exhibited strong antibacterial activity against pathogenic bacteria. Identification based on 16S rRNA revealed that of the twelve isolates, nine were identified as *Lactiplantibacillus plantarum* and three others as *Pediococcus acidilactici*. The twelve isolates showed high survival at low pH dan bile salt and exhibited antimicrobial activity against pathogen, hence they are considered as probiotic candidates.

Keywords: honey, lactic acid bacteria, *lactobacillus*, *pediococcus*, probiotic

ABSTRAK

Strain tertentu BAL terutama dari genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria* telah diketahui memiliki manfaat kesehatan sebagai probiotik. Madu diketahui memiliki khasiat yang bermanfaat bagi kesehatan dan mengandung BAL, namun informasi mengenai karakteristik BAL dari madu masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi BAL dari jenis madu yang berbeda dan mengevaluasi potensinya sebagai probiotik. BAL dihitung dan diisolasi dari madu yang dihasilkan oleh tiga jenis lebah madu yang berbeda: *Apis cerana*, *Heterotrigona itama*, dan *Trigona laeviceps*. Hasil penelitian menunjukkan jumlah BAL pada tiga madu yang berbeda berkisar antara $5,0 \times 10^1$ sampai $2,3 \times 10^7$ CFU/mL yang dipengaruhi oleh waktu pengambilan contoh yang berbeda, dengan jumlah BAL tertinggi pada madu *Heterotrigona itama*. Terdapat 48 isolat bakteri Gram positif katalase-negatif yang diperoleh dari tiga jenis madu yang berbeda. Dua belas isolat dipilih berdasarkan ketahanan hidup dalam garam empedu. Kedua belas isolat terpilih ditumbuhkan pada MRSB pH 2,5, dan MRSB dengan garam empedu 0,3%, serta menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri patogen. Identifikasi berdasarkan 16S rRNA mengungkapkan bahwa dari 12 isolat, sembilan isolat diidentifikasi sebagai *Lactiplantibacillus plantarum* dan tiga lainnya sebagai *Pediococcus acidilactici*. Kedua belas isolat BAL asal madu memiliki ketahanan yang tinggi terhadap pH rendah dan garam empedu serta mampu menghambat bakteri patogen, sehingga kedua belas isolat ini merupakan kandidat probiotik.

Kata kunci: bakteri asam laktat, *lactobacillus*, madu, *pediococcus*, probiotik

*Penulis Korespondensi: E-mail: lnuraida@apps.ipb.ac.id

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) adalah sekelompok mikroorganisme yang menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dalam metabolisme karbohidrat. Strain tertentu dari BAL terutama dari genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria* memiliki fungsi sebagai probiotik, sehingga strain tersebut dapat memberikan manfaat kesehatan terutama kesehatan saluran pencernaan. Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang jika dikonsumsi dalam jumlah yang memadai dapat memberikan manfaat kesehatan bagi konsumen (Hill *et al.*, 2014).

BAL terdapat dalam makanan fermentasi ataupun non-fermentasi. Madu dapat mengandung BAL dalam jumlah yang dapat mencapai 10^8 CFU/g madu segar (Olofsson *et al.*, 2016) Pada saluran pencernaan lebah madu telah dilaporkan terdapat BAL dari genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (Olofsson *et al.*, 2016). BAL dalam madu berasal dari nektar bunga yang merupakan bahan baku pembentukan madu. Nektar bunga berperan pada keanekaragaman pada kualitas madu, keamanan, dan kesehatan koloni (Mattila *et al.*, 2012).

Bakteri menguntungkan yang ditemukan bersimbiosis dengan lebah madu dan berada dalam madu di antaranya beberapa jenis bakteri asam laktat. *L. kunkeei*, *L. plantarum*, *L. apis*, *L. Paraplantarum*, dan *L. helsingborgensis* merupakan mikroba utama dari spesies *Lactobacillus* yang ditemukan pada berbagai madu jenis *Apis*, *bumblebees*, *sweat bees*, dan *stingless bees* (Endo dan Salminen, 2013, Mudroňová *et al.*, 2011, Olofsson *et al.*, 2014, Parichehreh *et al.*, 2018). Madu memiliki pH rendah yaitu antara pH 3,2 hingga 4,5 yang disebabkan oleh adanya asam organik (Almasaudi, 2021), sehingga BAL yang dapat bertahan dan tumbuh pada madu memiliki potensi untuk bertahan pada saluran pencernaan. Salah satu persyaratan sebagai bakteri probiotik adalah ketahanannya terhadap pH rendah pada lambung.

Indonesia merupakan salah satu negara penghasil madu dengan produksi cukup tinggi yang dihasilkan oleh berbagai spesies lebah yang berbeda. Setidaknya ada dua jenis lebah potensial penghasil madu yaitu lebah apini (lebah madu) dan meliponini (lebah tanpa sengat) dari famili *Apidae* (Mokaya *et al.*, 2022). Lima dari sembilan spesies lebah madu merupakan asli Indonesia yaitu *Apis andreniformis*, *A. dorsata*, *A. cerana*, *A. koschevnikovi* dan *A. nigrocincta* (Karyawati *et al.*, 2018). Lebah tanpa sengat yang menghasilkan madu di antaranya adalah lebah madu *Heterotrigona itama* dan *Trigona laeviceps* (Mokaya *et al.*, 2022). Meryandini *et al.* (2020) telah mengisolasi *L. rhamnosus* yang berpotensi sebagai probiotik dari *Apis dorsata* yang merupakan lebah liar di NTT. Oleh karena itu, penelitian ini menjadi penting dilakukan untuk memperoleh infor-

masi mengenai keragaman BAL dalam madu, karena madu yang mengandung BAL akan memiliki manfaat tambahan selain dari sifat fisiko kimianya. Eksplorasi BAL yang berasal dari madu penting untuk mengetahui keanekaragaman mikroorganisme simbiosis madu utamanya dari jenis BAL dan mengetahui potensinya sebagai probiotik. Tujuan dari penelitian ini untuk memperoleh informasi jumlah dan keragaman BAL pada madu dari lebah yang berbeda dan memperoleh isolat BAL asal madu yang memiliki potensi sebagai probiotik.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah madu segar yang diambil dari sarang madu di dua peternakan lebah madu di Kabupaten Bogor Provinsi Jawa Barat yaitu madu *Apis cerana* asal Perum Perhutani Pusat Perlebahan Nasional (Pusbahnas) di Desa Ciomas Kecamatan Tenjo, sedangkan madu *Heterotrigona itama* dan *Trigona laeviceps* dikumpulkan dari peternak madu lokal di Desa Bojong Kecamatan Kemang. Proses pengambilan madu dilakukan dengan cara mengambil madu beserta sarang lebah atau sisiran madu yang dikumpulkan secara acak dari lima (5) sarang lebah yang berbeda pada masing-masing spesies lebah. Masing-masing sampel disimpan dalam kontainer pada suhu ruang sebelum dianalisis. Pengambilan sampel dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Medium untuk isolasi dan identifikasi terdiri dari medium MRS (*de Man Rogosa Sharpe*) Agar dan broth (Oxoid, UK), Oxgall (Difco, USA), NB (*Nutrient Broth*), gliserol, aquadest, H₂O₂ 3%, mikroba uji *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, yang diperoleh dari Lab Mikrobiologi SEAFast Center IPB, dan kit *Genomic DNA Purification* (Promega, Amerika Serikat).

Enumerasi, isolasi dan identifikasi awal BAL

Sebanyak 25 g masing-masing sampel madu dimasukkan ke dalam 225 mL larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%) dan dihomogenkan (Vázquez-Quiñones *et al.*, 2018). Suatu seri pengenceran (10^{-1} - 10^{-6}) dibuat untuk masing-masing sampel. Satu mL dari pengenceran yang sesuai dituang MRS agar (Oxoid, UK) yang disuplementasikan dengan CaCO₃ 3% (Merck, Germany). Semua cawan diinkubasi pada 35°C selama 24-48 jam (Karyawati *et al.*, 2018) Penghitungan dilakukan pada cawan yang berisi 25-250 koloni sesuai BAM (2001), kultur kemudian diisolasi dengan mengambil 20 koloni dari cawan yang bisa dihitung lalu digoreskan pada MRS agar + CaCO₃ untuk memperoleh kultur murni BAL.

Setelah kultur murni diperoleh, selanjutnya, disebarkan untuk pewarnaan Gram sesuai dengan

prosedur baku (Varghese dan Joy, 2014) dan pengujian katalase (Varghese dan Joy, 2014). Isolat yang menunjukkan hasil pewarnaan Gram biru-ungu dan hasil uji katalase negatif disimpan dalam MRS broth yang mengandung 30% gliserol sebagai stok kultur. Penyimpanan jangka panjang isolat terpilih dilakukan liofilisasi.

Ketahanan terhadap garam empedu

Pengujian ketahanan isolat BAL terhadap garam empedu dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama pengujian pertumbuhan isolat dilakukan terhadap garam empedu. Isolat yang memiliki koefisien inhibisi rendah atau ketahanan tinggi, selanjutnya, dianalisis perubahan jumlahnya setelah paparan terhadap garam empedu.

Pertumbuhan pada garam empedu

Kemampuan isolat untuk tumbuh pada media mengandung garam empedu ditentukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Yazdi *et al.* (2017). Setiap isolat diinokulasi ke dalam MRS broth dan diinkubasi selama 24 jam pada 35°C. Isolat selanjutnya diinokulasi (1% v/v) ke dalam 10 mL MRS broth mengandung 0,3% (w/v) garam empedu (Difco). Kultur diinkubasi pada 35°C selama 6 jam. Absorbansi diukur pada 600 nm dan dibandingkan dengan kultur yang ditumbuhkan dalam MRS broth tanpa garam empedu serta dihitung koefisien inhibisinya dengan rumus berikut:

$$K_{inh} = \frac{(\Delta T_6 - T_0 \text{ kontrol} - \Delta T_6 - \Delta T_0 \text{ perlakuan})}{\Delta T_6 - T_0 \text{ kontrol}} \dots\dots\dots(1)$$

Δ = perbedaan absorbansi antara T₀ (pembacaan absorbansi pada jam ke-0) dan T₆ (pembacaan absorbansi pada jam ke-6). Berdasarkan perhitungan koefisien inhibisi (K_{inh}) isolat diklasifikasikan menjadi resisten (K_{inh} 0), tingkat pertumbuhan rendah (0,2 < K_{inh} < 0,4), dan rentan K_{inh} > 0,4.

Perubahan jumlah BAL setelah terpapar garam empedu

Kultur BAL pada MRSB berumur 24 jam diinokulasikan sebanyak 1% (v/v) ke dalam MRSB yang mengandung garam Oxgall 0,3% dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 6 jam. Penghitungan jumlah BAL dilakukan pada 0 dan 6 jam dengan menggunakan media MRSB dan diinkubasikan pada suhu 35°C selama 48 jam. Ketahanan terhadap garam empedu ditentukan dengan membandingkan antara populasi awal (0 jam) dan populasi BAL setelah paparan (6 jam) (Tokatli *et al.*, 2015).

Ketahanan terhadap pH rendah

Isolat yang dapat tumbuh pada MRSB dengan garam empedu, diuji ketahanannya terhadap pH rendah. Sebanyak 1 mL kultur yang ditumbuhkan

pada MRS selama 24 jam diinokulasikan ke dalam 9 mL PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 2,5 dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 35°C selama 3 jam. Setelah inkubasi, populasi BAL yang bertahan dihitung dengan cara ditumbuhkan pada media MRS agar (Oxoid, UK) setelah diencerkan dengan NaCl 0,85% dan diinkubasikan pada suhu 35°C selama 48 jam. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali ulangan secara duplo. Ketahanan terhadap pH rendah ditentukan dengan membandingkan antara populasi awal (0 jam) dan populasi BAL setelah pemaparan terhadap pH rendah (3 jam) (Tsai *et al.*, 2008).

Uji daya hambat isolat BAL terhadap bakteri patogen uji

Inokulum disiapkan dengan menumbuhkan BAL pada MSR broth selama 18 jam. Inokulum bakteri patogen uji *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, dan *Bacillus subtilis* disiapkan dengan menumbuhkan sebanyak 1 ose dalam 10 mL BHIB selama 18 jam pada suhu 35°C. Sejumlah 25 µL kultur dari setiap bakteri patogen disebarkan pada cawan berisi 25 mL nutrient agar. Sumur berukuran 6 mm dibuat pada agar menggunakan *cork borer* dan 50 µL kultur BAL uji diinokulasi pada sumur. Cawan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C. Penghambatan ditandai dengan terbentuknya zona bening. Diameter zona penghambatan diukur dari 3 sisi berbeda dan nilainya dirataratakan. Pengukuran diameter penghambatan dihasilkan dengan mengukur diameter setelah dikurangi diameter sumur. Daya hambat diklasifikasikan sebagai berikut: kekuatan penghambatan lemah (0-3 mm), sedang (3-6 mm), kuat (6-9 mm), dan sangat kuat (>9 mm) (Pan *et al.*, 2009).

Identifikasi isolat dengan gen 16S rRNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengekstraksi DNA genom dari masing-masing isolat BAL dengan kit ekstraksi DNA (Promega, USA). Proses ekstraksi dilakukan dengan mengikuti instruksi manual yang tersedia. Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1495R (5'CTACGGCTACCTTGTACGA-3') mengacu pada metode (Liu *et al.*, 2012). Campuran reaksi dengan total volume 30 µL terdiri atas 15 µL *Go Taq® Green Master Mix 2x* (Promega, USA), 0,6 µL primer 27F, 0,6 µL primer 1495R, 1,2 µL *template* dan 12,6 µL *Nuclease Free Water* (NFW). Kontrol negatif dibuat dengan cara yang sama namun 1,2 µL *template* digantikan dengan 1,2 µL NFW. Kondisi reaksi PCR yang digunakan adalah denaturasi awal 94°C 5 menit, 30 siklus penempelan primer 94°C 1 menit dan perpanjangan pada suhu 58°C 2 menit, 72°C 2 menit, dan tahap akhir 72°C 10 menit. Produk PCR kemudian diambil dan disimpan pada suhu 4°C untuk selanjutnya diperiksa dengan menggunakan

elektroforesis agarose dan diamati menggunakan sinar UV menggunakan Gel Doc (Bio-Rad, USA).

Produk PCR kemudian disekuensing di 1st Base Laboratories, Malaysia. Data hasil sekuensing lalu dianalisis pada program komputer Mega 11,0 untuk dicari homogenya melalui *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada pusat data GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sebuah pohon filogenetik berdasarkan gen 16S rRNA kemudian dikonstruksi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Enumerasi, Isolasi dan Identifikasi Awal BAL

BAL dalam madu dari tiga jenis lebah yang berbeda bervariasi berdasarkan tiap masing-masing bulan pengambilan sampel madu menunjukkan antara 5×10^1 sampai $2,3 \times 10^7$ CFU/mL dengan kisaran rata-rata jumlah BAL antara $2,9 \times 10^3$ sampai $8,9 \times 10^6$ CFU/mL, dengan jumlah BAL tertinggi pada madu *H. itama* (Tabel 1). Standar deviasi yang tinggi pada setiap jenis madu menunjukkan jumlah BAL pada jenis madu yang sama dari peternakan yang sama yang diambil dalam waktu yang berbeda sangat bervariasi. Jumlah dan keragaman BAL pada madu yang berbeda dari waktu ke waktu dipengaruhi oleh tahap pengembangan madu (Martinson *et al.*, 2012). Hal lainnya yang dapat mempengaruhi bervariasinya jumlah BAL pada madu yang sama adalah sumber asupan nektar dan polen (spesies bunga dan kandungan nutrisi), kesehatan lebah madu, mikrobiota usus antar lebah pada koloni (ratu, pekerja, dan larva), nutrisi (Saraiva *et al.*, 2015), kontrol kesehatan lebah madu (Guimarães-cestaro *et al.*, 2016), lokasi di dalam usus (Powell *et al.*, 2014), sistem pencernaan (Anderson *et al.*, 2013), tahap ontogenetik

(Hroncova *et al.*, 2015; Ludvigsen *et al.*, 2015). Perbedaan jumlah BAL pada madu yang berbeda dipengaruhi juga oleh spesies lebah (Ahn *et al.*, 2012), keragaman genetik lebah madu (Mattila *et al.*, 2012), namun demikian dalam penelitian ini tidak terdapat perbedaan nyata antar jenis spesies lebah. Faktor lingkungan seperti lokasi geografis (Hroncova *et al.*, 2015; Ludvigsen *et al.*, 2015), suhu udara, serta keberadaan mikroorganisme lain dalam nektar yang terkumpul (Russell dan McFrederick, 2021) memengaruhi komposisi dan jumlah BAL yang ada pada madu. Pada penelitian ini nampaknya waktu pengambilan madu yang menyebabkan terjadinya perbedaan jumlah BAL walaupun pada spesies yang sama. Jumlah sampel yang diambil pada setiap pengambilan cukup mewakili yaitu 5 buah sarang lebah yang berisi madu.

Sebanyak 48 BAL Gram positif katalase-negatif dengan zona bening di sekitar koloni pada MRSA yang disuplementasi CaCO₃ berhasil diisolasi, yang terdiri dari, 23 isolat asal madu *Apis cerana*, 21 isolat asal madu *Heterotrigona itama*, dan 4 isolat asal madu *Trigona laeviceps* (Tabel 1). Isolat BAL didominasi bentuk batang. Hasil pengamatan mikroskopik menunjukkan 18 isolat dari madu *A. cerana* berbentuk batang (basil) sedangkan 5 isolat lainnya berbentuk bulat (kokus), 16 isolat dari madu *H. itama* berbentuk batang (basil) sedangkan 5 isolat lain berbentuk bulat (kokus), dan 2 isolat dari madu *T. laeviceps* berbentuk batang (basil), sedangkan 2 isolat lain berbentuk bulat (kokus). Perbedaan jumlah isolat yang diperoleh antar madu disebabkan karena kemudahan tumbuh pada medium sintetik isolat asal *A. cerana* dan *H. itama* dibandingkan isolate asal *T. laeviceps*. Hal ini juga konsisten dengan jumlah BAL dari madu jenis *T. laeviceps* yang lebih rendah dari madu lainnya (Tabel 1).

Tabel 1. Total BAL pada madu dari tiga jenis lebah berbeda dan morfologi isolat yang diperoleh
Table 1. Total LAB counts in three different types of honey and morphology of the isolates

Jenis Lebah (Types of Honeybee)	Bulan Pengambilan (Sampling Time)	Jumlah BAL (CFU/mL) (Total LAB (CFU/mL))	Rerata Jumlah BAL (CFU/mL) (Mean of LAB Count (CFU/mL))	Rerata Jumlah BAL (log CFU/mL) (Mean of LAB Count (CFU/mL))	Karakteristik Isolat yang Diperoleh (Isolate Characteristics)	
					Gram Positif, Batang, Katalase Negatif (Gram Positive, Bacilli, Catalase Negative)	Gram Positif, Kokus, Katalase Negatif (Gram Positive, Cocci, Catalase Negative)
<i>Apis cerana</i>	Mei (May)	1.3×10^6	$4.3 \pm 7.5 \times 10^5$	4.00 ± 1.88	18	5
	Juni (June)	1.2×10^3				
	Juli (July)	4.7×10^2				
<i>Heterotrigona itama</i>	Mei (May)	5.0×10^1	$8.9 \pm 1.2 \times 10^6$	5.44 ± 2.87	16	5
	Juni (June)	2.3×10^7				
	Juli (July)	3.7×10^6				
<i>Trigona laeviceps</i>	Mei (May)	1.6×10^2	$2.9 \pm 3.5 \times 10^3$	3.20 ± 0.73	2	2
	Juni (June)	7.0×10^3				
	Juli (July)	1.7×10^3				

Keterangan: Hasil ditampilkan dengan ± standar deviasi dari tiga kali pengambilan sampel; Pada setiap pengambilan sampel, madu diambil dari 5 sarang lebah

Note: Means ± standard deviations of triplicate sampling are shown; For each sampling, honey was taken from 5 honeycomb

Ketahanan BAL terhadap garam empedu

Hasil pengujian pertumbuhan BAL dalam media yang mengandung garam empedu menunjukkan 46 dari 48 isolat bakteri asam laktat asal madu memiliki kemampuan tumbuh dan bertahan pada garam empedu 0,3% selama 6 jam dengan rata-rata kenaikan absorbansi 0,8726 dengan rentang kenaikan absorbansi dari 0,447-1,3950. Isolat Hi2b1 merupakan isolat dengan kenaikan absorbansi tertinggi yaitu 1,3950. Perbedaan ketahanan terhadap garam empedu dapat dikarenakan galur bakteri yang berbeda. Hal ini diperkuat dengan penelitian yang dilakukan oleh Nuraida *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa ketahanan BAL terhadap garam empedu bersifat *strain dependent*. Ketahanan masing-masing galur terhadap garam empedu mungkin diinduksi kehadiran beberapa protein. Toleransi garam empedu pada tiga strain *L. plantarum* berkorelasi dengan enam protein (GshR1, GshR4, Cfa2, Bsh1, OpuA, dan AtpH) yang mungkin penting terhadap respon dan adaptasi garam empedu pada *L. plantarum* (Oh dan Jung, 2015).

Kemampuan mentoleransi garam empedu 0,3% merupakan karakteristik yang penting dimiliki oleh bakteri probiotik yang merupakan prasyarat untuk dapat melewati saluran pencernaan dan sampai di kolon, sehingga digunakan sebagai seleksi awal dengan melihat kenaikan absorbansi dan nilai koefisien inhibisinya (K_{inh}). Isolat terpilih diseleksi dengan melihat nilai absorbansi pada garam empedu 0,3% selama 6 jam diatas rata-rata dan nilai K_{inh} . Berdasarkan nilai K_{inh} tidak ada isolat yang rentan terhadap garam empedu (nilai K_{inh} di bawah 0,4) bahkan 2 isolat menunjukkan resisten terhadap garam empedu (Tabel 2). Sebanyak 12 isolat yaitu isolat Ac1b9, Ac1b10, Ac2b1, Ac3b4, Ac3b5, Ac3k6,

Hi2b1, Hi2b2, Hi3b4, Hi3b7, Hi3k2, Ti2k3 terpilih berdasarkan dua kriteria tersebut untuk digunakan pada pengujian selanjutnya. Dari madu *A. cerana* terpilih enam isolat, dari madu *H. itama* sebanyak lima isolat dan dari madu *T. laeviceps* sebanyak satu isolat.

Perubahan jumlah BAL setelah paparan garam empedu

Hasil pengujian BAL terhadap garam empedu menunjukkan ketahanan hidup semua isolat >99%, ditandai oleh kemampuan untuk tumbuh dan memperbanyak diri dalam media yang mengandung 0,3% garam empedu. Rata-rata konsentrasi garam empedu pada usus manusia yaitu 0,3% (w/v) (Guo *et al.*, 2012). Semakin tinggi persentase ketahanan BAL maka semakin baik karakteristiknya sebagai kandidat probiotik. Penelitian Mulaw *et al.* (2019) menunjukkan bahwa semua isolat BAL yang diisolasi dari makanan fermentasi tradisional Etiopia menunjukkan toleransi yang tinggi terhadap kondisi garam empedu dengan tingkat ketahanan hidup berkisar antara 91,37-97,22%.

Penurunan atau kenaikan jumlah kedua belas isolat BAL setelah inkubasi selama 6 jam berkisar antara -0,1 sampai 0,1 log CFU/mL dan secara statistik tidak berbeda nyata (Tabel 3). Hal ini menunjukkan tidak ada perbedaan dalam ketahanan terhadap garam empedu dan semua isolat tahan terhadap garam empedu. Hal ini konsisten dengan pertumbuhan isolat BAL pada MRSB dengan garam empedu. Ketahanan BAL asal madu terhadap garam empedu telah diuji pada tiga isolat BAL asal sarang lebah madu *A. dorsata*, ketiga isolat tersebut mampu tumbuh dan bertahan pada kondisi garam empedu 0,3% selama 6 jam (Meryandini *et al.*, 2020).

Tabel 2. Morfologi dan nilai K_{inh} kedua belas isolat bakteri asam laktat asal madu
 Table 2. Morphology and K_{inh} values of the twelve LAB isolates

Kode Isolat (Isolate Code)	Asal Madu (Honey Origin)	Morfologi (Morphology)	Nilai K_{inh} * K_{inh} Value
Ac1b9	<i>Apis cerana</i>	Batang (<i>Bacilli</i>)	0.2 ^b
Ac1b10	<i>Apis cerana</i>	Batang (<i>Bacilli</i>)	0.1 ^c
Ac2b1	<i>Apis cerana</i>	Batang (<i>Bacilli</i>)	0.3 ^a
Ac3b4	<i>Apis cerana</i>	Batang (<i>Bacilli</i>)	0.2 ^b
Ac3b5	<i>Apis cerana</i>	Batang (<i>Bacilli</i>)	0.3 ^a
Ac3k6	<i>Apis cerana</i>	Kokus (<i>Cocci</i>)	0.0 ^d
Hi2b1	<i>Heterotrigona itama</i>	Batang (<i>Bacilli</i>)	0.1 ^c
Hi2b2	<i>Heterotrigona itama</i>	Batang (<i>Bacilli</i>)	0.2 ^b
Hi3b4	<i>Heterotrigona itama</i>	Batang (<i>Bacilli</i>)	0.3 ^a
Hi3b7	<i>Heterotrigona itama</i>	Batang (<i>Bacilli</i>)	0.2 ^b
Hi3k2	<i>Heterotrigona itama</i>	Kokus (<i>Cocci</i>)	0.0 ^d
Ti2k3	<i>Trigona laeviceps</i>	Kokus (<i>Cocci</i>)	0.2 ^{bc}

Keterangan: *Berdasarkan nilai koefisien inhibisi (K_{inh}) isolat diklasifikasikan menjadi resisten ($K_{inh} \approx 0$), tingkat pertumbuhan rendah ($0.2 < K_{inh} < 0.4$), dan rentan $K_{inh} > 0.4$. Nilai pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf *superskrip* yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada uji Duncan ($p > 0,05$)

Note: *Based on the calculated coefficient of inhibition (C_{inh}) isolates were classified into ($C_{inh} \approx 0$), low growth ($0.2 < C_{inh} < 0.4$), and sensitive ($C_{inh} > 0.4$). Values in similar column followed by the same letters are not significantly different in Duncan's test ($p > 0.05$)

Tabel 3. Ketahanan isolat BAL pada pH 2,5 selama 3 jam dan garam empedu 0,3% selama 6 jam
 Table 3. Survival of LAB isolates in pH 2.5 for 3 h and in 0.3% bile salts for 6 h

Isolat BAL (LAB Isolate)	Ketahanan BAL pada pH 2,5 (LAB Survival at pH 2.5)		Ketahanan BAL pada Garam Empedu (LAB Survival in Bile Salts)		Total Δ Jumlah Sel (log CFU/mL) (Total Δ of Cell Count (log CFU/mL))
	Rata-rata Δ (log CFU/mL) (Δ Mean (log CFU/mL))	Rata-rata Ketahanan Hidup (%) (Mean of Survival (%))	Rata-rata Δ (log CFU/mL) (Δ Mean (log CFU/mL))	Rata-rata Ketahanan Hidup (%) (Mean of Survival (%))	
Ac1b9	-0.2±0.06 ^a	97.26±0.70 ^a	-0.0±0.02 ^a	99.53±0.25 ^a	-0.3 ^a
Ac1b10	0.0±0.08 ^c	100.27±0.87 ^d	0.1±0.07 ^a	100.92±0.81 ^a	0.1 ^c
Ac2b1	-0.1±0.04 ^{abc}	98.80±0.47 ^{abcd}	-0.0±0.06 ^a	99.64±0.75 ^a	-0.1 ^{abc}
Ac3b4	0.0±0.14 ^c	100.28±1.60 ^d	0.0±0.04 ^a	100.29±0.51 ^a	0.0 ^{bc}
Ac3b5	-0.3±0.03 ^a	96.86±0.35 ^a	0.0±0.08 ^a	99.98±0.93 ^a	-0.3 ^a
Ac3k6	0.0±0.04 ^{bc}	99.54±0.46 ^{bcd}	0.1±0.06 ^a	101.03±0.65 ^a	0.1 ^{bc}
Hi2b1	-0.2±0.09 ^{ab}	98.06±0.99 ^{abc}	0.0±0.06 ^a	100.37±0.68 ^a	-0.1 ^{abc}
Hi2b2	0.1±0.02 ^c	100.68±0.18 ^d	0.0±0.09 ^a	100.37±1.05 ^a	0.1 ^c
Hi3b4	0.0±0.12 ^{bc}	99.65±1.44 ^{cd}	0.1±0.05 ^a	100.70±0.64 ^a	0.0 ^{bc}
Hi3b7	0.0±0.05 ^{bc}	99.68±0.56 ^{cd}	0.0±0.05 ^a	100.12±0.55 ^a	0.0 ^{bc}
Hi3k2	-0.1±0.11 ^{ab}	98.65±1.30 ^{abcd}	0.1±0.13 ^a	101.09±1.57 ^a	0.0 ^{abc}
Ti2k3	-0.2±0.18 ^a	97.58±2.02 ^{ab}	0.1±0.06 ^a	100.59±0.68 ^a	-0.2 ^{ab}

Keterangan: Nilai pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf *superskrip* yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada uji Duncan ($p>0,05$)

Note: Values in similar column followed by the same letters are not significantly different in Duncan's test ($p>0.05$)

Yao *et al.* (2018) melaporkan bahwa BAL mempunyai enzim *bile salt hydrolase* (BSH) yang mampu mengkatalisis dekonjugasi (pemecahan) garam empedu dengan menghidrolisis ikatan amida asam amino taurin atau glisin. BAL asal kefir memiliki ketahanan yang lebih lemah dari BAL isolat asal madu, dengan penurunan sebesar 0,69-1,59 log CFU/mL (Yusuf *et al.*, 2020). Mikroenkapsulasi dengan *Cellulose microfiber* dapat meningkatkan ketahanan terhadap garam empedu (Pato *et al.*, 2022).

Ketahanan BAL terhadap pH rendah

Hasil pengamatan uji ketahanan BAL pada pH rendah menunjukkan kedua belas isolat BAL mampu bertahan >95% bahkan sedikit meningkat (100,68%) pada pH 2,5 selama 3 jam (Tabel 3). Penurunan jumlah BAL tertinggi sebesar 0,3 log CFU/mL. Walaupun secara statistik berbeda, namun penurunan dengan kisaran 0-0,3 log CFU/mL menunjukkan ketahanan yang sangat baik yang diperlukan oleh BAL sebagai kandidat probiotik. Tidak ada kecenderungan BAL dari madu mana yang lebih tahan terhadap paparan pH rendah. Kemampuan isolat BAL bertahan pada pH rendah berkorelasi dengan pH madu yaitu sekitar 3,2 hingga 4,5 (Almasaudi, 2021). Dibandingkan dengan isolat BAL asal kefir yang mengalami penurunan sebesar 0,57 and 2,04 log CFU/mL (Yusuf *et al.*, 2020), ketahanan BAL asal madu lebih tahan pH rendah. Ketahanan BAL terhadap pH dapat diperbaiki dengan enkapsulasi dalam *cellulose microfiber* (Pato *et al.*, 2022), namun BAL asal madu tanpa enkapsulasi telah memiliki ketahanan terhadap asam yang sangat baik.

Total penurunan BAL akibat paparan terhadap pH rendah dan garam empedu dari kedua belas isolat

BAL kurang dari 0,5 log CFU/mL, sementara penurunan BAL asal kefir karena paparan asam dan garam empedu berkisar antara 1,69-3,28 log CFU/mL (Yusuf *et al.*, 2020). Hal ini mengindikasikan kedua belas BAL asal madu ini akan mampu melewati lambung dan usus halus serta mencapai kolon dalam keadaan hidup. Ketahanan BAL terhadap paparan asam dan garam empedu diperlukan untuk dapat mempertahankan viabilitas ketika mencapai kolon. Dengan penurunan sebesar 0,5 log CFU/mL, jumlah BAL yang mencapai kolon di atas 8 log CFU. Jumlah di atas 7,0 log CFU yang dapat mencapai kolon diperlukan untuk memberikan manfaat terapi (Pato *et al.*, 2022). Kedua belas isolat ini berpotensi sebagai probiotik. Namun demikian, pengujian *in vitro* lainnya seperti resistensi terhadap antibiotik, kemampuan menempel pada sel epitel masih harus dilakukan, sehingga isolat dapat dinyatakan sebagai bakteri probiotik.

Kemampuan daya hambat isolat BAL terhadap bakteri patogen uji

Kemampuan untuk menghambat patogen bervariasi antar isolat dan bakteri uji. Secara keseluruhan, sebanyak sembilan isolat memiliki daya hambat yang kuat dari madu *A. cerana* dan *H. itama*, 2 isolat memiliki daya hambat sedang dan satu isolat (Ti2k3) yang berasal dari madu *T. laeviceps* memiliki daya hambat yang lemah terhadap patogen uji (Tabel 4). Empat isolat yaitu Ac1b9, Ac1b10, Ac2b1, H2b1 memiliki kemampuan menghambat kuat sampai sangat kuat terhadap *B. subtilis*, *L. monocytogenes* dan *E. coli*. Isolat Ac1b10 dan Ac1b9 yang berasal dari madu *Avis cerana* secara keseluruhan memiliki daya hambat yang paling kuat.

Tabel 4. Kemampuan daya hambat isolat BAL terhadap bakteri patogen uji
 Table 4. The inhibitory activity of LAB against pathogenic bacteria

Isolat BAL (LAB Isolate)	Diameter Zona Hambat (mm) (Diameter of Inhibition Zone (mm))				Rerata (Mean)	Daya Hambat (Inhibition Strength)
	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>		
Ac1b9	7.7±0.68 ^g	9.4±0.12 ^{ef}	6.2±0.61 ^{bc}	5.6±0.12 ^{de}	7.2±0.1 ^{fg}	Kuat (Strong)
Ac1b10	7.8±0.65 ^g	9.1±0.53 ^e	7.6±1.36 ^c	5.6±0.12 ^{de}	7.5±0.3 ^g	Kuat (Strong)
Ac2b1	6.8±1.53 ^{fg}	8.6±0.12 ^d	6.1±0.51 ^{bc}	5.8±0.42 ^e	6.9±0.4 ^{ef}	Kuat (Strong)
Ac3b4	6.5±1.00 ^{efg}	9.7±0.20 ^f	5.6±0.17 ^{bc}	5.5±0.00 ^{de}	6.8±0.2 ^{ef}	Kuat (Strong)
Ac3b5	5.0±1.62 ^{cdef}	9.7±0.29 ^f	6.5±1.76 ^{bc}	4.5±1.00 ^{bc}	6.4±0.6 ^{de}	Kuat (Strong)
Ac3k6	2.0±0.40 ^{ab}	4.6±0.10 ^b	3.4±0.12 ^a	3.5±0.06 ^a	3.4±0.1 ^b	Sedang (Medium)
Hi2b1	6.7±1.33 ^{fg}	8.6±0.10 ^d	6.2±0.64 ^{bc}	3.5±0.89 ^a	6.3±0.4 ^{de}	Kuat (Strong)
Hi2b2	4.5±1.78 ^{cde}	8.5±0.06 ^d	6.2±0.61 ^{bc}	5.7±0.40 ^{de}	6.2±0.3 ^{de}	Kuat (Strong)
Hi3b4	5.8±0.58 ^{defg}	7.6±0.12 ^c	5.0±1.08 ^{ab}	5.6±0.12 ^{de}	6.0±0.4 ^d	Kuat (Strong)
Hi3b7	4.0±1.80 ^{bcd}	8.6±0.17 ^d	6.8±2.00 ^{bc}	4.8±0.58 ^{cd}	6.1±0.2 ^d	Kuat (Strong)
Hi3k2	3.3±0.17 ^{bc}	4.5±0.00 ^b	4.8±0.83 ^{ab}	4.6±0.12 ^{bc}	4.3±0.2 ^c	Sedang (Medium)
Ti2k3	1.0±0.87 ^a	2.8±0.35 ^a	3.6±0.85 ^a	3.8±0.58 ^{ab}	2.8±0.5 ^a	Lemah (Weak)
Rerata Zona Hambat (mm) (Mean of Inhibition Zone (mm))	5.1±2.35	7.6±2.26	5.7±1.49	4.9±0.94	5.8±1.5	

Keterangan: Hasil pengukuran diameter daya hambat (setelah dikurangi diameter sumur), diklasifikasikan sebagai berikut: 1) kekuatan penghambatan lemah (0-3 mm), 2) sedang (3-6 mm), 3) kuat (6-9 mm), dan 4) sangat kuat (>9 mm); Nilai pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf *superskrip* yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada uji Duncan ($p>0,05$)

Note: The results of the measurement of the inhibition diameter (after deducting the diameter of the well), were classified as follows: 1) weak inhibition (0-3 mm), 2) medium (3-6 mm), 3) strong (6-9 mm), and 4) very strong (>9 mm). Values in similar column followed by the same letters are not significantly different in Duncan's test ($p>0.05$)

Kedua belas isolat hanya memiliki kemampuan yang sedang untuk menghambat *S. Typhimurium*. Isolat BAL yang berasal dari granula kefir memiliki daya hambat kuat terhadap *S. Typhimurium* dan *E. coli* (Yusuf *et al.*, 2020). Diantara bakteri uji, penghambatan terbesar oleh isolat BAL asal madu ditunjukkan terhadap *L. monocytogenes* yang merupakan bakteri Gram positif seperti halnya bakteri asam laktat. *Pediococcus pentosaceus* strain 2397 yang berasal dari dadih dilaporkan memiliki daya hambat yang kuat terhadap *L. monocytogenes* (Pato *et al.*, 2021). Aktivitas antibakteri BAL terjadi melalui beberapa mekanisme seperti produksi metabolit seperti asam laktat, asam asetat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin (Chen *et al.*, 2019), namun dalam penelitian ini belum diketahui antimikroba lain selain asam laktat yang diproduksi oleh kedua belas isolat. Kompetisi terhadap nutrisi dalam medium pertumbuhan merupakan salah satu mekanisme penghambatan (Chen *et al.*, 2019). Aktivitas antagonis yang ditunjukkan oleh spesies BAL juga dapat berbeda dipengaruhi oleh sumber dari mana galur tertentu diisolasi serta jenis asam organik yang diproduksi (Oldak *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2019). Secara umum, asam organik yang merupakan metabolit utama bakteri asam laktat adalah asam laktat. Pada penelitian ini sebagian besar isolat adalah *L. plantarum* (Tabel 5) yang merupakan bakteri asam laktat homofermentatif yang menghasilkan asam laktat sebagai meta-

bolit utama dari fermentasi gula. Bervariasinya daya hambat terhadap bakteri uji mengindikasikan diproduksinya senyawa antimikroba lain selain asam, terutama yang menghambat *L. monocytogenes*. Beberapa isolate bakteri asam laktat yang berasal dari dadih memproduksi bakteriosin yang menghambat *L. monocytogenes* (Pato *et al.*, 2020).

Identifikasi isolat dengan 16S rRNA

Hasil sekuensing kedua belas isolat menunjukkan potongan gen sekitar 1439 pasang basa (Tabel 5). Setelah disejajarkan (*alignment*) dan mencari homologi potongan gen tersebut pada *GenBank*, diperoleh hasil yang menunjukkan seluruh isolat memiliki kesamaan urutan basa 100% dengan strain yang berada pada *GenBank*. Isolat yang memiliki kesamaan urutan basa $\geq 97\%$ dapat dianggap sebagai spesies yang sama (Huang *et al.*, 2018). Isolat dengan kode Ac3k6, Hi3k2, dan Ti2k3 diidentifikasi sebagai *Pediococcus acidilactici* strain DHR013 yang sama dengan strain 5541 (100%), empat isolat yaitu Ac1b9, Ac3b4, Ac3b5, dan Hi2b1 terkait erat dengan strain *Lacticplantibacillus plantarum* strain 7232 dan strain 2877 dengan kesamaan sebesar (100%) dan sebanyak lima isolat yaitu, Ac1b10, Ac2b1, Hi2b2, Hi3b4, dan Hi3b7 sangat dekat hubungan kekerabatannya dengan *Lacticplantibacillus plantarum* strain 3360 dan strain 2964 dengan nilai kesamaan sebesar (100,00%).

BAL yang memiliki ketahanan garam dan empedu dari madu *A. cerana* dan *H. itama* didominasi oleh *Lactiplantibacillus plantarum*. Spesies ini merupakan nama spesies baru yang tadinya *Lactobacillus plantarum* (Zheng *et al.*, 2020). Spesies *Lactiplantibacillus* diisolasi dari berbagai pangan fermentasi dan juga ditemukan pada habitat insekta atau pada saluran pencernaan vertebrata (Zheng *et al.*, 2020). Keberadaan *L. plantarum* pada madu juga dilaporkan oleh peneliti lainnya (Mudroňová *et al.*, 2011; Parichehreh *et al.*, 2018). Keberadaan *Pediococcus acidilactici* pada madu belum pernah dilaporkan oleh peneliti

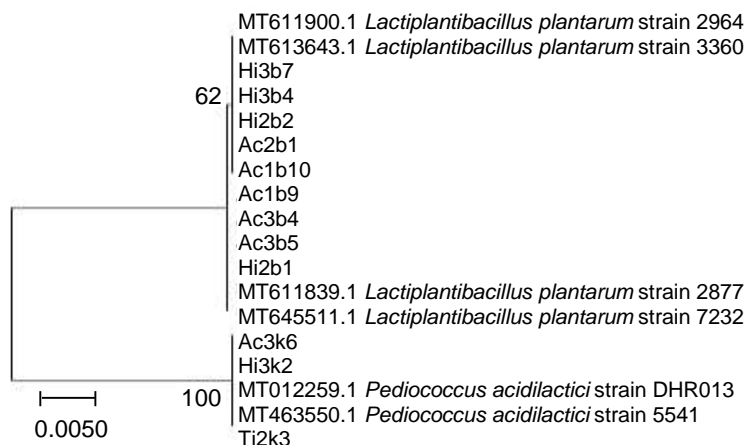
lainnya. BAL ini berada pada ketiga jenis madu dan tahan terhadap paparan asam dan garam empedu.

Kekerabatan isolat BAL berdasarkan pohon filogenetik

Konstruksi pohon filogeni dibentuk dari 12 sekuen BAL asal madu ditambah tiga sekuen yang homolog dari *GeneBank*, serta satu isolat pembandingan di luar grup. Gambar 1 menunjukkan rekonstruksi pohon filogeni yang membentuk dua cabang yaitu cabang *Lantiplantibacillus plantarum* dan *P. Acidilactici* dengan nilai *bootstrap* sebesar 100% (Gambar 1).

Tabel 5. Identitas 12 isolat asal tiga jenis madu yang berbeda berdasarkan 16S rRNA
 Table 5. Identity of 12 isolates from three different types honey based on 16S rRNA

Kode Isolat (Isolate Code)	Homologi dengan GenBank/Accession Number (Homology with GenBank/Accession Number)	Pasang Basa (Base Pairs)	Tingkat Kesamaan (%) (Acidity %)
Ac1b9	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain 7232/MT645511.1 dan strain 2877/MT611839.1	1439	100.00
Ac1b10	<i>Lacticplantibacillus plantarum</i> strain 3360/MT613643.1 dan strain 2964/MT611900.1	1439	100.00
Ac2b1	<i>Lacticplantibacillus plantarum</i> strain 3360/MT613643.1 dan strain 2964/MT611900.1	1439	100.00
Ac3b4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain 7232/MT645511.1 dan strain 2877/MT611839.1	1439	100.00
Ac3b5	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain 7232/MT645511.1 dan strain 2877/MT611839.1	1439	100.00
Ac3k6	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 5541/MT463550.1 dan strain DHR013/MT012259.1	1449	100.00
Hi2b1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain 7232/MT645511.1 dan strain 2877/MT611839.1	1439	100.00
Hi2b2	<i>Lacticplantibacillus plantarum</i> strain 3360/MT613643.1 dan strain 2964/MT611900.1	1439	100.00
Hi3b4	<i>Lacticplantibacillus plantarum</i> strain 3360/MT613643.1 dan strain 2964/MT611900.1	1439	100.00
Hi3b7	<i>Lacticplantibacillus plantarum</i> strain 3360/MT613643.1 dan strain 2964/MT611900.1	1439	100.00
Hi3k2	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 5541/MT463550.1 dan strain DHR013/MT012259.1	1449	100.00
Ti2k3	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 5541/MT463550.1 dan strain DHR013/MT012259.1	1449	100.00



Gambar 1. Pohon filogenetik berdasarkan homologi sekuen gen 16S rRNA metode *neighbor-joining* dari 12 isolat BAL asal madu

Figure 1. Phylogenetic tree based on the homology of 16S rRNA gene sequence by neighbor-joining method of 12 LAB isolates from honey

Nilai *bootstrap* pada percabangan menunjukkan persentase nilai akurasi percabangan dengan perhitungan sebanyak 1000 kali pengacakan (Tamura *et al.*, 2007). Nilai *bootstrap* menunjukkan divergensi dan pemisahan percabangan tersebut akurat, konsisten, dan tidak akan berubah walaupun dilakukan dengan metode rekonstruksi lain, percabangan tersebut bersifat permanen atau signifikan (Yonatika *et al.*, 2021).

KESIMPULAN

Madu mengandung BAL yang bervariasi dengan jumlah antara $5,0 \times 10^1$ sampai $2,3 \times 10^7$ CFU/mL. BAL asal madu yang memiliki ketahanan tinggi terhadap garam empedu dan pH rendah didominasi oleh *Lactiplantibacillus plantarum* (sembilan isolat) dan berasal dari madu *A. cerana* dan *H. itama*. *P. acidilactici* yang memiliki ketahanan tinggi terhadap garam empedu dan pH rendah terdapat pada ketiga jenis madu. Kedua belas isolat asal madu dari lebah yang berbeda berpotensi sebagai probiotik. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menguji persyaratan lainnya untuk dapat dikategorikan sebagai probiotik dan mengidentifikasi sifat fungsionalnya dalam mendukung kesehatan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jendral Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini dalam skema pendanaan penelitian dan pengabdian kepada masyarakat tahun anggaran 2018 Pendidikan Magister Menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) [nomor: 4427/IT3.11/PN/2018]. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Sdr. Ainis Nurlaila, SSI dan Sdr. Ariyanti yang telah membantu teknis penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahn J, Hong I, Bok J, Kim B, Song J, Weon H. 2012. Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. J Microbiol 50: 735-745. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-2188-0>
- Almasaudi S. 2021. The antibacterial activities of honey. Saudi J Biol Sci 28: 2188-2196. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.017>
- Anderson KE, Sheehan TH, Mott BM, Maes P, Snyder L, Schwan MR, Walton A, Jones BM, Corby-Harris V. 2013. Microbial ecology of the hive and pollination landscape: Bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). PLoS One 8: 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083125>
- [BAM] Bacteriological Analytical Manual. 2001. Aerobic Plate Count. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam> [22 Maret 2019].
- Chen CC, Lai CC, Huang HL, Huang WY, Toh HS, Weng TC, Chuang YC, Lu YC, Tang HJ. 2019. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Front Microbiol 10: 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00789>
- Endo A, Salminen S. 2013. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. Syst Appl Microbiol 36: 444-448. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.06.002>
- Guimarães-cestaro L, Serrão JE, Message D. 2016. Simultaneous detection of *Nosema* spp., *Ascosphaera apis* and *Paenibacillus larvae* in honey bee products. J Hymenopt Res 49: 43-50. <https://doi.org/10.3897/JHR.49.7061>
- Guo C, Zhang L, Li J, Zhang Y, Xue C, Yi H, Du M, Han X. 2012. Screening of bile salt hydrolase-active lactic acid bacteria for potential cholesterol-lowering probiotic use. Adv Mater Res 345: 139-146. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.345.139>
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder P, Sanders ME. 2014. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 11: 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hroncova Z, Havlik J, Killer J, Doskocil I, Tyl J, Kamler M. 2015. Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age, and geographic location. PLoS One 10: 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118707>
- Hu CH, Ren LQ, Zhou Y, Ye BC. 2019. Characterization of antimicrobial activity of three *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional dairy food. Food Sci Nutr 7: 1997-2005. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1025>
- Huang CH, Li SW, Huang L, Watanabe K. 2018. Identification and classification for the *Lactobacillus casei* group. Front Microbiol 9: 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01974>

- Karyawati AT, Nuraida L, Lestari Y, Meryandini A. 2018. Characterization of abundance and diversity of lactic acid bacteria from *Apis dorsata* hives and flowers in East Nusa Tenggara, Indonesia. *Biodiversitas* 19: 845-851. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d190319>
- Liu W, Bao Q, Jirimutu, Qing M, Siriguleng, Chen X, Sun T, Li M, Zhang J, Yu J, Bilige M, Sun T, Zhang H. 2012. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. *Microbiol Res* 167: 110-115. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.05.001>
- Ludvigsen J, Rangberg A, Avershina E, Sekelja M, Kreibich C, Gro A, Rudi K. 2015. Shifts in the midgut/pyloric microbiota composition within a honey bee apiary throughout a season. *Microbes Env* 30: 235-244. <https://doi.org/10.1264/j sme2.ME15019>
- Martinson VG, Moy J, Moran NA. 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl Environmental Microbiol* 78: 2830-2840. <https://doi.org/10.1128/AEM.07810-11>
- Mattila HR, Rios D, Walker-Sperling VE, Roeselers G, Newton ILG. 2012. Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. *PLoS One* 7: e32962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032962>
- Meryandini A, Karyawati AT, Nuraida L, Lestari Y. 2020. Lactic acid bacteria from *Apis dorsata* hive possessed probiotic and angiotensin-converting enzyme inhibitor activity. *Makara J Sci* 24: Article 7. <https://doi.org/10.7454/mss.v24i1.11728>
- Mudroňová D, Toporčák J, Nemcová R, Gancarčíková S, Hajdučková V, Rumanovská K. 2011. *Lactobacillus* sp. as a potential probiotic for the prevention of *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. *J Apic Res* 50: 323-324. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.4.11>
- Mulaw G, Sisay T, Muleta D, Tesfaye A. 2019. *In vitro* evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented Ethiopian food products. *Int J Microbiol* 2019: 7179514. <https://doi.org/10.1101/574194>
- Nuraida L, Winarti S, Prangdimurti E. 2011. Evaluasi *in vitro* terhadap kemampuan isolat bakteri asam laktat asal air susu ibu untuk mengasimilasi kolesterol dan mendekongugasi garam empedu. *J Teknol Industri Pangan* 22: 46-52.
- Oh YJ, Jung DS. 2015. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from *Omegisool*, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea. *Food Sci Technol* 63: 437-444. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.005>
- Ołdak A, Zielińska D, Rzepkowska A, Kołozyn-Krajewska D. 2017. Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski cheese. *Biomed Res Int* 2017: 1-10. <https://doi.org/10.1155/2017/6820369>
- Olofsson TC, Alsterfjord M, Nilson B, Butler È, Vásquez A. 2014. *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus melliferu* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 3109-3119. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059600-0>
- Olofsson TC, Butler È, Markowicz P, Lindholm C, Larsson L, Vásquez A. 2016. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees - an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *Int Wound J* 13: 668-679. <https://doi.org/10.1111/iwj.12345>
- Pan X, Chen F, Wu T, Tang H, Zhao Z. 2009. The acid, bile tolerance, and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control* 20: 598-602. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.019>
- Pato U, Yusuf Y, Fitriani S, Jonnadi NN, Wahyuni MS, Feruni JA, Jaswir I. 2020. Inhibitory activity of crude bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from dadih against *Listeria monocytogenes*. *Biodiversitas* 21: 1295-1302. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210404>
- Pato U, Yusuf Y, Fitriani S, Tartila, Yeni R, Fadillah F, Husnaini L. 2021. Optimization of the growth of *Pediococcus pentosaceus* Strain 2397 in inhibiting pathogenic *Listeria monocytogenes*. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 757: 012056. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/757/1/012056>
- Pato U, Ayu DF, Riftyan E, Restuhadi F, Pawenang WT, Firdaus R, Rahma A, Jaswir I. 2022. Cellulose microfiber encapsulated probiotic: Viability, acid and bile tolerance during storage at different temperature. *Emerg Sci J* 6: 106-116. <https://doi.org/10.28991/ESJ-2022-06-01-08>

- Parichehreh S, Tahmasbi G, Sarafrazi A, Imani S, Tajabadi N. 2018. Isolation and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the gastrointestinal tract of the dwarf honey bee, *Apis florea* Fabricius, 1973 (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 49: 430-438. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0569-z>
- Powell JE, Martinson VG, Urban-Mead K, Moran NA. 2014. Routes of acquisition of the gut microbiota of *Apis mellifera*. *Appl Environ Microbiol* 80: 7378-7387. <https://doi.org/10.1128/AEM.01861-14>
- Russell KA, McFrederick QS. 2021. Elevated temperature may affect nectar microbes, nectar sugars, and bumble bee foraging preference. *Microb Ecol* 84: 473-482. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01881-x>
- Saraiva MA, Zemolin APP, Franco JL, Boldo JT, Stefenon VM, Triplett EW, Camargo FA de O, Roesch LFW. 2015. Relationship between honeybee nutrition and their microbial communities. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107: 921-933. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0384-8>
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Tokatli M, Gülgör G, Elmacı SB, İşleyen NA, Özçelik F. 2015. *In vitro* properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *Biomed Res Int* 2015: 1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/315819>
- Tsai C, Lin P, Hsieh Y. 2008. Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown *in vitro*. *Anaerob* 14: 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2007.11.003>
- Varghese N, Joy PP. 2014. *Manual Microbiology*. India: Karala Agricultural University.
- Vázquez-Quiñones CR, Moreno-Terrazas R, Natividad-Bonifacio I, Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C. 2018. Microbiological assessment of honey in México. *Rev Argent Microbiol* 50: 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.005>
- Yao L, Seaton SC, Ndousse-Fetter S, Adhikari AA, DiBenedetto N, Mina AI, Banks AS, Bry L, Devlin AS. 2018. A selective gut bacterial bile salt hydrolase alters host metabolism. *Elife* 17: e37182. <https://doi.org/10.7554/eLife.37182>
- Yazdi MKS, Davoodabadi A, Zarin HRK, Ebrahimi MT, Dallal MMS. 2017. Characterisation and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Iranian traditional yogurts. *J Anim Sci* 16: 185-188. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2016.1222888>
- Yonatika NO, Widiasih N, Hamidah M, Nurhakim MD, Budiarto H, Bintang DMC, Sani LMI, Lestari DF, Setyaningsih WA, Subhan B, Madduppa H. 2021. Genetic structure and phylogenetic relationships of *Phyllidiellapustulosa* species from Seribu Islands, North Sulawesi, Halmahera, and West Papua. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*. 944 012028. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/944/1/012028>
- Yusuf D, Nuraida L, Dewanti-Hariyadi R, Hunaefi D. 2020. *In vitro* characterization of lactic acid bacteria from Indonesian kefir grains as probiotics with cholesterol-lowering effect. *J Microbiol Biotechnol* 30: 726-732. <https://doi.org/10.4014/jmb.1910.10028>
- Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG, Lebeer S. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 70: 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>