

***STRAIN IMPROVEMENT* BAKTERI ASAM LAKTAT UNTUK INDUSTRI PANGAN**



Endang S. Rahayu (Penanggung Jawab)

Nurul Mutmainah; Abraham Novian Oliver; Efitras Adib Aziezah; Marcella Jessica;
Kevin Kusuma Lie; Ivan Felix Tandela; Jocelyn Tanya; Christophorus R Obed H;
Gerarda Tania Yudhanti; Sitaresmi; Anastasia Celestine; Bunga Khairina F A;
M. Fauzan Kennedy; Okta Cesario Eka D W; Inas Khoirunnisa; Misael Chandra

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI PANGAN DAN HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS GADJAH MADA YOGYAKARTA
2020**

PRAKATA

Pertama kali diucapkan Puji Syukur kepada Gusti Allah Yang Maha Kuasa, atas Berkah luar biasa yang diberikan pada kita semua, sehingga kumpulan tugas paper ini dapat diselesaikan dengan baik.

Di dalam mata kuliah **Bioteknologi Pangan 2020**, dikarenakan pandemik covid-19, maka kuliah tidak dilakukan sebagaimana biasanya, yaitu tatap muka, namun digantikan dengan sistem daring, atau *on line*. Bahkan waktu kuliah yang masih 3 minggu, juga diperpendek menjadi 1 minggu. Sehingga perlu dilakukan inovasi agar kualitas perkuliahan tetap terjaga. Oleh karena itu, presentasi mahasiswa yang tidak jadi dilakukan, digantikan dengan menulis paper bersama dengan judul **STRAIN IMPROVEMENT BAKTERI ASAM LAKTAT UNTUK INDUSTRI PANGAN** yang berbasis lima jurnal utama.

1. *Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations* oleh Josiane E Garneau, Sylvain Moineau (2011)
2. *Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds* oleh Maria Papagianni (2012)
3. *The art of strain improvement of industrial lactic acid bacteria without the use of recombinant DNA technology* oleh Patrick MF Derkx, Thomas Janzen, Kim I Sørensen, Jeffrey E Christensen, Birgitte Stuer-Lauridsen, Eric Johansen (2014)
4. *Genome editing of lactic acid bacteria: opportunities for food, feed, pharma and biotech* oleh Rosa A. Bö rner, Vijayalakshmi Kandasamy, Amalie M. Axelsen, Alex T. Nielsen and Elleke F. Bosma (2019)
5. *Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria* oleh Tina Vida Plavec and Aleš Berlec (2020)

Pemilihan terhadap topik Bakteri Asam Laktat adalah sejalan dengan penelitian unggulan yang telah lama dilakukan oleh **Para Peneliti Bakteri Asam Laktat dan Probiotik di Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG)** dan **Fakultas Teknologi Pertanian (FTP), Universitas Gadjah Mada**. Bahkan **Food and Nutrition Culture Collection (FNCC)** yang dimiliki PSPG juga memiliki koleksi sejumlah strain bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai probiotik dan kultur starter, untuk mendukung penelitian terkait bagi masyarakat akademik maupun umum.

Mempelajari jurnal terbaru juga merupakan suatu kebutuhan untuk memperkaya ilmu pengetahuan serta di dalam melakukan inovasi di dalam penelitian. Dalam paper ini semua pustaka ditampilkan untuk mempermudah para pembaca di dalam menelusuri pustaka-pustaka yang diacu di dalam membuat paper ini.

Terima kasih kepada para mahasiswa yang telah menyelesaikan masing-masing tugas papernya sehingga dapat dirangkum menjadi satu. Semoga kumpulan paper yang masih jauh dari sempurna ini bermanfaat bagi para mahasiswa khususnya yang tertarik di bidang bioteknologi pangan, khususnya bakteri asam laktat.

Salam bahagia dan tetap semangat

Endang S. Rahayu

Mei 2020

DAFTAR ISI

Prakata	2
Pendahuluan Bakteri Asam Laktat – Endang S. Rahayu	3
Topik 1. Manfaat Bakteri Asam Laktat untuk Industri Pangan (Nurul Mutmainah D.O - 17/410566/TP/11852)	7
Topik 2. Bakteriofag yang Menyerang Bakteri Asam Laktat dan Dampaknya pada Industri Fermentasi (Abraham Novian Oliver - 17/414001/TP/11943)	10
Topik 3. Sumber Kontaminasi Fag pada Fermentasi Susu oleh Bakteri Asam Laktat dan Cara Deteksi (Efitras Adib Aziezah - 17/414017/TP/11959)	15
Topik 4. Cara Penanganan Kontaminasi Fag pada Fermentasi Susu oleh Bakteri Asam Laktat (Marcella Jessica - 17/414025/TP/11967)	20
Topik 5. Rekayasa Metabolisme pada Bakteri Asam Laktat (Kevin Kusuma Lie - 17/414024/TP/11966)	30
Topik 6. Pembentukan Flavor oleh Bakteri Asam Laktat (Ivan Felix Tandela - 17/414022/TP/11964)	34
Topik 7. Pembentukan <i>Sweeteners</i> (Pemanis) oleh Bakteri Asam Laktat (Jocelyn Tanya - 17/410561/TP/11847)	42
Topik 8. Produksi Eksopolisakarida (EPS) (Christophorus R Obed Hae - 17/414016/TP/11958)	46
Topik 9. Produksi Asam Folat oleh Bakteri Asam Laktat (Gerarda Tania Yudhanti – 17/410557/TP/11843)	51
Topik 10. <i>Strain Improvement</i> Pada Bakteri Asam Laktat. Tanpa Penggunaan Teknologi Rekombinasi DNA (Sitaresmi - 17/415289/TP/12025)	56
Topik 11. Eliminasi Sifat Resistensi Antibiotik pada Bakteri Asam Laktat (Anastasia Celestine - 17/414007/TP/11949)	61
Topik 12. Eliminasi Metabolisme Sitrat (Bunga Khairina Fa - 12/329632/TP/10362)	66
Topik 13. Peningkatan Toleransi Terhadap Etanol dan <i>Bile Salt</i> (M. Fauzan Kennedi - 17/415286/TP/12022)	70
Topik 14. <i>Genome Editing</i> Dan Aplikasinya pada Bakteri Asam Laktat untuk Fermentasi Dan Probiotik (Okta Cesario Eka Dhanar Wijaya - 17/414031/TP/11973)	74
Topik 15. Keamanan Bakteri Aasam Laktat Hasil Rekayasa Genetika (Inas Khoirunnisa - 15/385572/TP/11441)	82
Topik 16. Teknologi DNA Rekombinan Pada Bakteri Asam Laktat di Bidang Pangan (Misael Chandra - 15/385585/TP/11454)	87

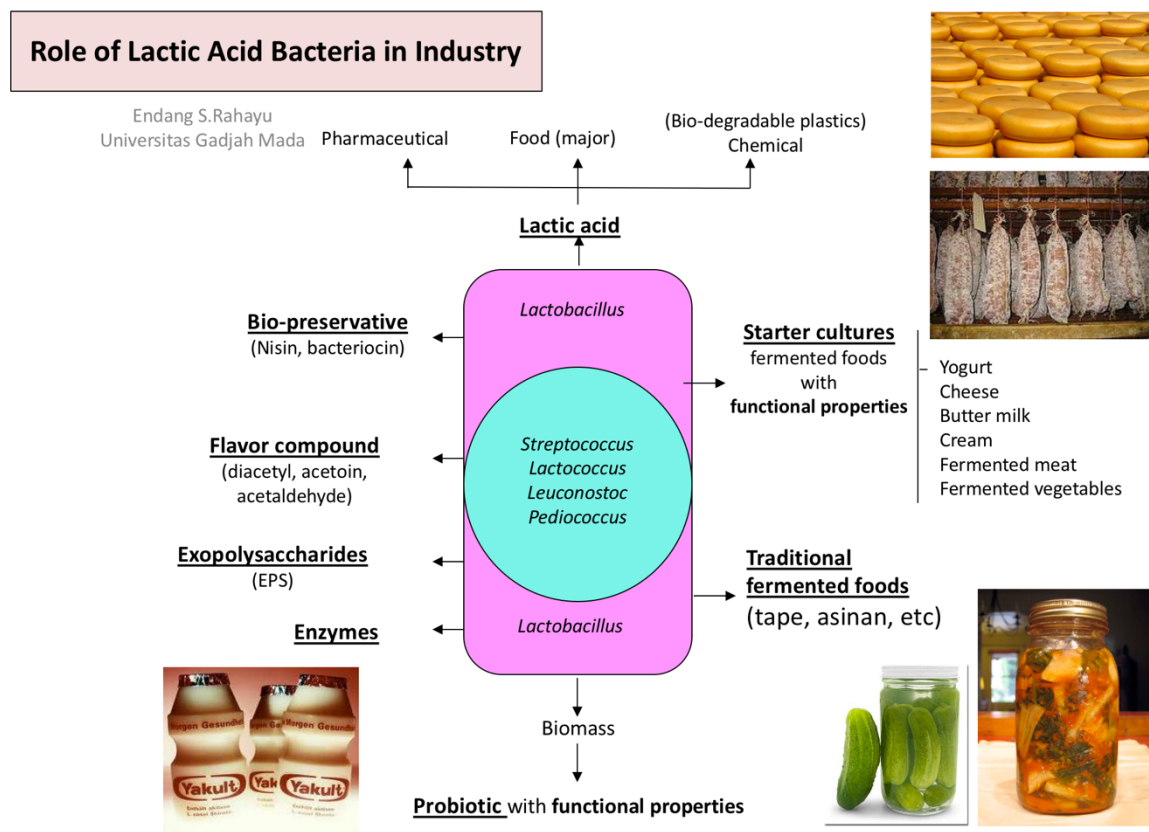
BAKTERI ASAM LAKTAT
PENDAHULUAN
(Endang S. Rahayu)

Bakteri asam laktat diartikan sebagai kelompok bakteri Gram positif, berbentuk panjang atau bulat, tidak berspora, tidak melakukan respirasi dan tidak memiliki katalase, menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir utama selama fermentasi karbohidrat. Bakteri asam laktat banyak ditemukan pada buah dan sayur segar, fermentasi makanan baik yang berasal dari hewani maupun nabati, pada tanaman, jalur genital, saluran pencernaan, maupun saluran pernapasan pada manusia dan hewan. Bakteri asam laktat dikenal sebagai bakteri yang non-patogen, bahkan di bidang pangan peranannya justru lebih banyak yang menguntungkan dibanding yang merugikan. Bakteri asam laktat pada proses fermentasi makanan, tidak hanya memberikan flavor dan rasa yang spesifik tetapi juga dapat memberikan keawetan dan keamanan (*food safety*) pada produk akhir yang berasal dari asam laktat maupun asam organik lainnya sebagai hasil metabolisme selama proses fermentasi berlangsung. Asam yang dihasilkan ini dapat menurunkan pH dan membuat lingkungan menjadi tidak cocok bagi pertumbuhan bakteri pembusuk dan patogen. Di samping asam organik, beberapa bakteri asam laktat mampu menghasilkan berbagai komponen dengan sifat antagonistik terhadap bakteri lain, di antaranya bakteriosin, hidrogen peroksida, dan diasetil. Walaupun pada umumnya bakteri asam laktat yang terdapat pada makanan tidak bersifat patogen, namun beberapa spesies *Streptococcus* ternyata memiliki sifat patogen terhadap manusia.

Di bidang industri, bakteri asam laktat ini telah dimanfaatkan untuk berbagai hal seperti disajikan pada Gambar 1. Asam laktat sebagai hasil metabolit ini dapat dimurnikan dan dapat digunakan sebagai ingredien pangan, untuk bidang farmasi, dan industri kimia, contohnya, sebagai bahan dasar plastik (*biodegradable* plastik). Bakteri asam laktat dapat digunakan untuk menghasilkan komponen flavor, enzim, eksopolisakarida. Bahkan bakteri asam laktat dapat juga digunakan sebagai agensia pengawet makanan (biopreservasi) melalui komponen bakteriosin yang dihasilkan. Di bidang pangan, bakteri asam laktat memiliki potensi untuk dimanfaatkan ke dalam beberapa hal: (a) sebagai starter (inokulum) fermentasi makanan, contohnya starter untuk produksi yogurt, keju; (b) terlibat di dalam makanan fermentasi tradisional (tape, *kimchi*, *sauerkraut*, asinan sayur, dan buah-buahan); (c) sebagai agensia probiotik dengan berbagai manfaat kesehatan.

Di dalam pengembangan bakteri baik ini, berbagai potensi yang dimiliki dapat dikombinasikan. Penggunaan bakteri asam laktat penghasil bakteriosin sebagai kultur starter diperkirakan dapat menghasilkan makanan fermentasi yang lebih aman dan awet, terutama apabila proses fermentasi berlangsung secara alami. Contohnya penelitian yang telah dilakukan di Fakultas Teknologi Pertanian (FTP) dan Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gadjah Mada, yaitu aplikasi kultur starter *Pediococcus acidilactici* F-11 penghasil bakteriosin untuk mengontrol fermentasi peda, fermentasi sayuran, dan lainnya. Ternyata *Pediococcus* dan bakteriosinnya dapat menghambat bakteri pembusuk, bakteri penghasil histamin, coliform dan patogen. Bakteriosin PaF-11, produk dari *Pediococcus acidilactici* F-11 juga dapat digunakan untuk preservasi tahu, bakteriosin yang ditambahkan pada tahu simpan dingin dapat menekan pertumbuhan bakteri dan memperpanjang masa kadaluwarsa. Walaupun tahu lebih awet namun harga juga melonjak 50% lebih mahal.

Bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai agensia probiotik juga dapat dimanfaatkan sebagai starter proses fermentasi sehingga produk fermentasi yang dihasilkan juga dapat berfungsi sebagai pembawa agensia probiotik, contoh yang sudah tidak asing lagi adalah Yakult dengan *Lactobacillus casei* strain Shirota. Penelitian tentang bakteri asam laktat juga telah banyak dilakukan di PSPG dan FTP, UGM. Mulai isolasi dari berbagai sumber (makanan fermentasi tradisional, buah-buahan, sayuran, feses bayi, dll), identifikasi serta skrining untuk mengetahui manfaat yang dapat diperoleh dari bakteri baik ini. Para peneliti PSPG dan FTP UGM juga telah mempunyai probiotik lokal yang diunggulkan. Probiotik lokal juga telah berhasil digunakan sebagai kultur starter untuk membuat yogurt probiotik yang disukai oleh konsumen, yang tidak kalah dengan yogurt dengan kultur impor.



Gambar 1.1. Peran Bakteri Asam Laktat di Bidang Industri

Topik yang dipilih dalam kumpulan paper ini adalah **Strain Improvement Bakteri Asam Laktat untuk Industri Pangan**. Beberapa teknik telah digunakan untuk meningkatkan kemampuan bakteri asam laktat di bidang industri, agar potensi yang diinginkan dapat ditingkatkan, baik melalui rekayasa metabolisme maupun teknologi DNA rekombinan. Namun dalam paper ini juga dibahas hal yang menarik, adalah peran bakteriofag (virus bakteri) atau disebut fag di dalam kegagalan proses fermentasi menggunakan BAL.

Di awal paper ini (Paper 1) membahas secara umum tentang manfaat bakteri asam laktat untuk industri pangan. Pada paper ini ditampilkan juga berbagai *pathway* yang dimiliki

oleh BAL, seperti metabolisme karbon, metabolisme sekunder, biokonversi maupun sintesis *de novo* untuk menghasilkan berbagai jenis komponen organik sebagai produk akhir yang penting.

Paper 2 membahas tentang fag, yang menyerang bakteri asam laktat. Serangan fag dapat menggagalkan proses fermentasi di industri, sehingga dapat mengakibatkan kerugian yang besar. Paper ini membahas siklus hidup fag, pertama adalah siklus litik, saat fag melakukan replikasi pada sel inang, dilanjutkan lisis sel inang dan membebaskan fag hasil replikasi. Kedua adalah lisogenik, yaitu dengan menggabungkan genomnya (genom fag) ke genom sel inang dan melakukan replikasi *in situ*. Paper 3 membahas sumber kontaminasi fag pada fermentasi susu oleh BAL dan cara deteksinya. Dilanjutkan dengan Paper 4, yang membahas tentang cara penanganan kontaminasi fag pada fermentasi susu oleh BAL. Fag atau virus yang menyerang bakteri, khususnya bakteri asam laktat memang menjadi topik bahasan, saat inipun dunia juga sedang menghadapi masalah virus corona, covid-19, yang mampu mengubah masyarakat dengan kebiasaan baru, khususnya terkait dengan *personal hygiene* untuk menghindari penularan virus ini melalui kontak tubuh.

Paper 5 membahas rekayasa metabolisme pada bakteri asam laktat, khususnya ditujukan untuk produksi L-asam laktat, yang selanjutnya dapat digunakan untuk tujuan yang lain. Topik 6 membahas pembentukan flavor oleh bakteri asam laktat, yaitu diasetil dan asetaldehida. Topik 7 membahas pembentukan *sweeteners* (pemanis) oleh BAL, meliputi L-alanin, manitol, sorbitol, dan xilitol. Paper 8 membahas produksi eksopolisakarida (EPS) oleh BAL, dan cara peningkatannya melalui rekayasa metabolisme. Sintesis EPS secara *in situ* dapat meningkatkan karakter produk pangan dari aspek reologi serta sensori meliputi *mouthfeel* dan tekstur produk sehingga dalam dalam industri sering digunakan sebagai pengental, pengemulsi, dan *gelling agent*. Selain itu, EPS juga dapat meningkatkan fungsi kesehatan produk pangan akibat perannya sebagai prebiotik serta kemampuan bioaktivasi yang baik sehingga memiliki aktivitas anti inflamasi dan anti virus.

Paper 9 membahas produksi asam folat oleh bakteri asam laktat. Telah diketahui bahwa asam folat merupakan mikronutrien yang penting untuk kehidupan, sehingga produksi asam folat oleh BAL ini juga menjadi topik paper yang menarik, termasuk bagaimana meningkatkan sintesis folat ini oleh BAL melalui modifikasi genetika.

Topik 10 membahas secara umum *strain improvement* pada bakteri asam laktat tanpa penggunaan teknologi rekombinan DNA, atau sering juga disebut sebagai *natural strain improvement* dengan contoh untuk meningkatkan resistensi BAL terhadap fag dan resistensi terhadap stres; meningkatkan produksi eksopolisakarida (EPS) dan metabolisme karbohidrat; menurunkan asidifikasi dan meningkatkan pembentukan flavor; penghambatan metabolisme sitrat, dan penghilangan (eliminasi) aktivitas urease.

Topik 11 membahas eliminasi sifat resistensi antibiotik pada bakteri asam laktat. Topik 12 eliminasi metabolisme sitrat, hal ini diperlukan untuk strain yang dimanfaatkan di dalam fermentasi malolaktat pada pembuatan wine. Topik 13 membahas tentang peningkatan toleransi terhadap etanol dan *bile salt*. Bakteri asam laktat yang tahan terhadap *bile salt* berpotensi digunakan sebagai agensia proniotik.

Topik 14, membahas *genome editing* dan aplikasinya pada bakteri asam laktat untuk fermentasi dan probiotik. Dilanjutkan dengan topik 15 tentang keamanan BAL hasil rekayasa genetika. Sedang topik 16 membahas teknologi DNA rekombinan pada BAL di bidang pangan. Topik-topik ini merupakan topik utama pada saat kita membahas rekayasa DNA terkini di bidang pangan.

TOPIK 1
MANFAAT BAKTERI ASAM LAKTAT UNTUK INDUSTRI PANGAN
(Nurul Mutmainah D.O - 17/410566/TP/11852)

Penggunaan bakteri asam laktat untuk produksi pangan sudah ada sejak puluhan tahun hingga ratusan tahun lalu. Pada mulanya bakteri asam laktat digunakan untuk fermentasi secara tradisional untuk beberapa produk makanan, seperti produk susu, daging, sayur, kedelai, dll. Contoh produk pangan tradisional terfermentasi yang hingga saat ini masih banyak dipasarkan, antara lain adalah tape, tempe, dan acar. Dikarenakan hasil fermentasi produk makanan menggunakan bakteri asam laktat mempunyai nilai gizi yang bagus untuk kesehatan tubuh serta bersifat GRAS (*Generally Recognized as Safe*), maka proses yang mulanya dijalankan secara tradisional dikembangkan menjadi skala industri dengan adanya pemilihan strain bakteri asam laktat yang terbaik hingga dilakukan *strain improvement* dengan tujuan menghasilkan produk yang mempunyai nilai gizi lebih, *yield* tinggi, dan terkontrol proses fermentasinya.

Karakteristik bakteri asam laktat diantaranya adalah bakteri ini merupakan Gram positif, berbentuk rod atau cocci dan menghasilkan formasi tetrad, tidak menghasilkan spora, bereaksi negative pada enzim katalase, bersifat toleran terhadap kadar asam yang tinggi, fastidious (hanya dapat tumbuh apabila mediumnya mengandung nutrisi yang sesuai dengan kebutuhannya), *non-motile*, *facultative anaerob/micro-aero-tolerant*, dengan produk akhir utama dari fermentasi gula adalah asam laktat (Marco *et al*, 2017).

Pemanfaatan bakteri asam laktat tidak hanya dalam industri pangan saja, tetapi juga pada industri farmasi maupun kimia (*biodegradable plastic*). Jenis bakteri asam laktat yang banyak digunakan pada industri adalah *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, dan *Pediococcus*. Pada bidang pangan, bakteri asam laktat juga dapat berperan sebagai *bio-preservative* dengan menghasilkan bakteriosin sehingga mencegah tumbuhnya mikroorganisme pembusuk makanan. Proses fermentasi bakteri asam laktat dapat terjadi melalui berbagai *pathway*, seperti *central carbon metabolism*, *secondary carbon metabolism*, *bioconversion*, maupun *synthesis de novo* sehingga menghasilkan berbagai jenis komponen organik sebagai produk akhirnya. Berikut merupakan komponen organik yang dihasilkan proses metabolisme oleh bakteri asam laktat dalam Siedler *et al* (2019) :

Sifat antimikroorganisme yang dihasilkan bakteri asam laktat berasal dari sinergesis antar komponen yang dihasilkan. Berdasarkan penelitian Corsetti *et al* dalam Siedler *et al* (2019), menunjukkan bahwa terjadi sinergesis antar asam organik dalam menghambat fungi. Asam organik tersebut dihasilkan oleh bakteri asam laktat strain *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 yang diisolasi dari sourdough. Asam-asam organik yang saling bersinergi tersebut adalah asam asetat, asam kaproat, asam format, asam propionat, asam butirat, dan n-asam valerat. Dalam melakukan percobaan ini, dilakukan dengan cara menguji asam organik secara individu terhadap *Fusarium graminearum* dan didapatkan hasil bahwa tidak terjadi efek *inhibitory*, sedangkan apabila semua asam organik tersebut melakukan sinergesis maka didapatkan efek *inhibitory* terhadap *Fusarium graminearum*.

Selain sebagai antimikroorganisme, bakteri asam laktat juga berperan dalam menghasilkan komponen flavor sehingga mampu meningkatkan sensori suatu bahan pangan, salah satunya adalah dalam biji kopi. Bakteri asam laktat mampu menghasilkan komponen bioaktif, seperti ester, keton, alkohol, aldehida yang mampu mempengaruhi atribut sensori kopi yaitu munculnya flavor flora, *fruity*, dan *buttery*. Fungsi bakteri asam laktat pada kopi juga berperan dalam degradasi lapisan *mucilage* (lendir) yang terdiri atas gula sederhana,

karbohidrat kompleks dan protein sehingga proses post-harvest yang diperlukan berkurang dari 21 hari menjadi 7 hari (Pereira *et al*, 2020).

Bakteri asam laktat mampu menghasilkan eksopolisakarida (EPS), yang menurut Xu *et al* (2019) EPS ini akan di sekresi ke lingkungan eksternal dalam bentuk slime EPS maupun menempel pada permukaan bakteri sehingga membentuk kapsul EPS. Status bakteri asam laktat adalah GRAS sehingga EPS yang dihasilkan pun juga bersifat GRAS sehingga komponen ini banyak digunakan dalam industri pangan. EPS dapat berfungsi sebagai *thickener* alami, emulsifier, maupun stabilizer dalam meningkatkan tekstur makanan. EPS juga memberikan efek kesehatan, diantaranya adalah sebagai antioksidan, antihipertensi, menurunkan kolesterol, dan mampu meningkatkan populasi bakteri baik dalam usus sehingga mencegah kanker kolon dengan adanya polisakarida dengan ikatan β -(1-6) yang lebih rendah (Ji *et al*, 2018). Efek anti kanker juga didukung dengan adanya komponen asam uronat, gugus sulfat, glukosa, dan ikatan glikosida dengan tipe β (Li *et al*, 2015). Aplikasi EPS banyak digunakan dalam produk es krim, keju, roti, yoghurt, minuman, dan daging.

Peran lain dari bakteri asam laktat adalah mampu menghasilkan enzim fitase yang berfungsi untuk meningkatkan *bioavailability nutrient* dari makanan yang tinggi fitat. Fitat merupakan turunan dari myopinositol yang mengandung 6 gugus fosfat dengan muatan negatif pada seluruh molekulnya sehingga berafinitas kuat terhadap komponen nutrient dengan muatan positif, seperti Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , dan beberapa turunan gugus asam amino sehingga menurunkan solubilitas dan bioavailabilitas dalam pencernaan di tubuh manusia. Hal tersebut menyebabkan fitat bersifat sebagai anti-nutrient dan menyebabkan tubuh mengalami defisiensi mikronutrien (Waters *et al*, 2015 dalam Sharma *et al*, 2020).

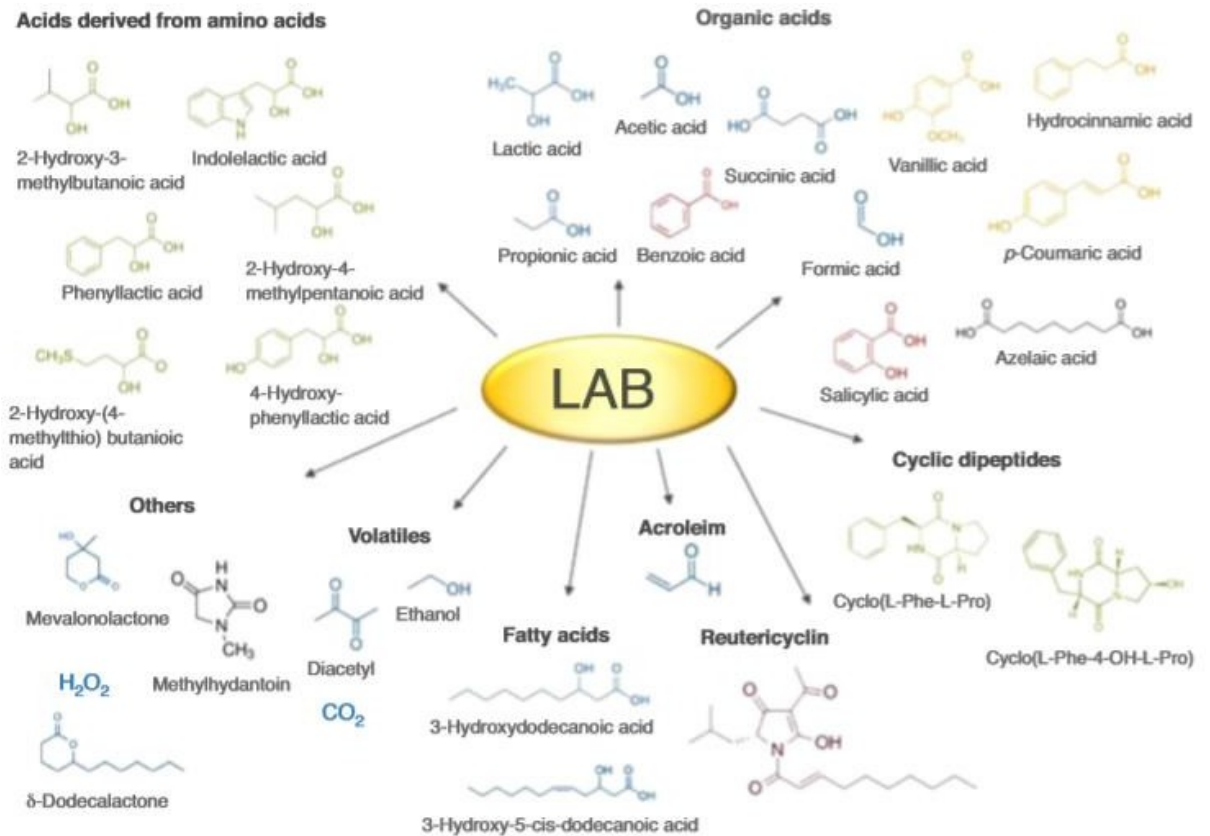
Fitat dapat dihilangkan secara non-enzimatik maupun enzimatik. Tetapi, menurut Gupta *et al* (2015) degradasi fitat dengan cara enzimatik lebih efisien. Enzim yang berperan dalam hal ini adalah fitase. Enzim fitase yang banyak digunakan pada industri makanan berasal dari bakteri asam laktat karena berstatus GRAS. Fitase dari bakteri asam laktat mampu menghidrolisis asam fitat dengan melepaskan gugus fosfat secara berurutan. Hidrolisis ini mampu melepaskan ion logam yang berbeda yang kemudian meningkatkan komponen *soluble* dan *ionic* sehingga meningkatkan bioavailabilitas. Selain itu, hidrolisis fitase mampu menghasilkan myo-inositol dalam bentuk yang berbeda dimana komponen ini berperan penting dalam meregulasi beberapa proses metabolisme (Sharma *et al*, 2020).

Salah satu contoh aplikasi bakteri asam laktat untuk hidrolisis fitat adalah pada proses brewing. Menurut percobaan Giri *et al* (2018), proses brewing menggunakan starter *Lactobacillus plantarum* L7 mampu meningkatkan nilai komponen nutrisi pada bir yang diproduksi, seperti Na, Ca, Mg, Mn, dan Fe.

Banyaknya manfaat bakteri asam laktat serta statusnya GRAS, menjadikan bakteri ini banyak digunakan dan dikembangkan dalam industri pangan maupun industri lainnya, seperti farmasi maupun kimia. Selain itu banyak dilakukan penelitian untuk menjaga kestabilan starter bakteri asam laktat yang digunakan dalam industri pangan, misalnya dilakukan enkapsulasi. Kestabilan bakteri asam laktat yang diaplikasikan ke dalam produk pangan harus terjaga sehingga tidak mengurangi manfaat kesehatan yang dihasilkan dari bakteri asam laktat yang digunakan tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

Giri, S. S., Sen, S. S., Saha, S., Sukumaran, V., & Park, S. C. (2018). *Use of a potential probiotic, Lactobacillus plantarum L7, for the preparation of a rice-based fermented beverage*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 473.



- Gupta, R. K., Gangoliya, S. S., & Singh, N. K. (2015). "Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains". *Journal of Food Science & Technology*, 52(2), 676–684.
- Marco, Maria L, Dustin Heeney, Sylvie Binda, Christopher J Cifelli, Paul D Cotter, Benoit Foligné, Michael Gänzle, et al. "Health Benefits of Fermented Foods: Microbiota and Beyond." *Current Opinion in Biotechnology* 44 (2017): 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>.
- Pereira, Gilberto V De Melo, Alexander Da Silva Vale, Dão Pedro De Carvalho Neto, Elisângela Sm Muynarsk, Vanete Thomaz Soccol, and Carlos R Soccol. "Lactic Acid Bacteria: What Coffee Industry Should Know?" *Current Opinion in Food Science* 31 (2020): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.004>.
- Sharma, Neha, Steffy Angural, Monika Rana, Neena Puri, Kanthi Kiran Kondepudi, and Naveen Gupta. "Phytase Producing Lactic Acid Bacteria: Cell Factories for Enhancing Micronutrient Bioavailability of Phytate Rich Foods." *Trends in Food Science & Technology* 96 (2020): 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.001>.
- Siedler, Solvej, Rafik Balti, and Ana Rute Neves. "Bioprotective Mechanisms of Lactic Acid Bacteria against Fungal Spoilage of Food." *Current Opinion in Biotechnology* 56 (2019): 138–46. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.015>.
- Xu, Yuanmei, Yanlong Cui, Fangfang Yue, Lihua Liu, Yuanyuan Shan, Bianfang Liu, Yuan Zhou, and Xin Lü. "Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Structures, Physicochemical Functions and Applications in the Food Industry." *Food Hydrocolloids* 94 (2019): 475–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.032>.

TOPIK 2
BAKTERIOFAG YANG MENYERANG BAKTERI ASAM LAKTAT
DAN DAMPAKNYA PADA INDUSTRI FERMENTASI
(Abraham Novian Oliver - 17/414001/TP/11943)

Bakteriofag

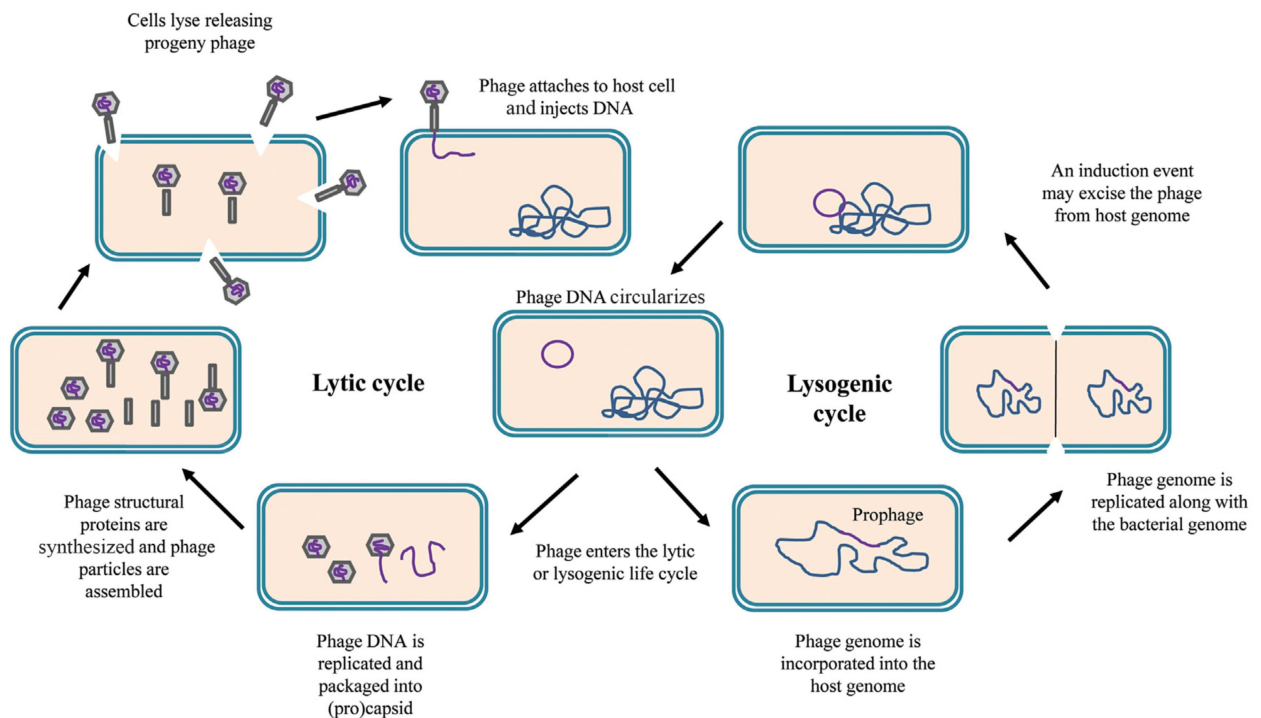
Bakteriofag adalah virus yang dapat menginfeksi bakteri, dengan jumlah keberadaan paling banyak di planet bumi dan dapat ditemukan di dalam setiap ekologi terkecil sekalipun yang dapat mendukung kehidupan bakteri (Chibani-Chennoufi et al, 2004). Bakteriofag terdiri dari asam nukleat (DNA rantai tunggal, DNA rantai ganda, atau RNA) dan membutuhkan inang yang mampu mensintesa DNA dan memiliki kemampuan produksi protein agar dapat dengan efektif bereplikasi dan membentuk partikel virus yang baru. Bakteriofag mulai diteliti semenjak 100 tahun yang lalu, ketika peneliti dari Inggris bernama Frederick Twort membawa sampel virus pada media pertumbuhan sintesis ke Brown Institute, University of London.

Bakteriofag pada bakteri asam laktat

Bakteri Asam Laktat (BAL) sangat beragam dan diantaranya ada yang memiliki strain yang cocok untuk diaplikasikan pada industri fermentasi dan *dairy product* diantaranya adalah *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc*, dan *Lactobacillus* (Makarova et al, 2006). Proses fermentasi dan pengolahan *dairy product* dengan memanfaatkan BAL sangat menguntungkan bagi industri pangan karena dapat menambah umur simpan produk, memberi flavor tertentu dan memberi keuntungan yang berlipat bagi pelaku industri pangan (Ross et al, 2002). Namun karena pada industri *dairy product* bergantung pada proses biologis dengan fermentasi oleh bakteri, sangat memungkinkan terjadinya kontaminasi oleh bakteriofag yang sangat signifikan mengganggu proses produksi. Kontaminasi bakteriofag dapat membatasi kecepatan asidifikasi oleh kultur starter yang berakibat pada terganggunya proses fermentasi dan dapat menyebabkan banyaknya kehilangan biomassa pada produk akhir atau *yieldnya* rendah. Bakteriofag diklasifikasikan berdasarkan karakteristik morfologinya dan sequen genomnya. Setiap jenis bakteriofag pada umumnya spesifik dapat mengkontaminasi jenis bakteri tertentu misalnya bakteriofag pada *Lactococcus lactis* (Mahony dan van Sideren, 2014).

Siklus hidup bakteriofag

Siklus hidup bakteriofag dapat terbagi menjadi 2 siklus, yaitu siklus litik dan siklus lisogenik. Pada akhirnya, semua bakteriofag harus melalui siklus litik untuk dapat melakukan replikasi dan melepaskan virus baru dengan melakukan lisis pada sel inangnya. Siklus litik dapat dibagi menjadi beberapa tahap, yaitu: (1) *attachment*, (2) *DNA entry*, (3) *replication*, (4) *assembly*, dan (5) *release* (gambar. 2.1). Namun, mungkin ada beberapa kondisi yang tidak memungkinkan untuk bakteriofag melakukan siklus litik sehingga beberapa bakteriofag melakukan siklus lisogenik dengan menggabungkan genomnya dengan genom sel inang dan melakukan replikasi *in situ* (Moldovan et al, 2007). Proses ini memungkinkan bakteriofag melakukan replikasi secara diam-diam setiap kali bakteri melakukan pembelahan biner. Ketika kondisi lingkungan sudah membaik, bakteriofag lisogenik akan keluar dari genom inangnya dan memasuki siklus litik.



Gambar 2.1. Siklus litik dan lisogenik pada bakteriofag

Attachment Bakteriofag dan DNA Entry

Tahap pertama dalam siklus infeksi bakteriofag adalah pendeteksian bakteriofag oleh molekul reseptor yang spesifik pada permukaan sel inang kemudian berlanjut dengan proses *attachment* atau penempelan. Penempelan bakteriofag pada permukaan sel inang dapat bersifat *reversible* ataupun *irreversible* (Moldova *et al*, 2007). Interaksi pada bakteriofag sangat spesifik untuk setiap bakteriofag dan bakteri inangnya dan juga molekul reseptor pada sel target dapat bervariasi untuk bakteri yang berbeda. Secara umum bakteriofag BAL membutuhkan keberadaan kation divalen seperti Ca^{2+} atau Mg^{2+} agar proses penempelan dapat berhasil (Wang *et al*, 2010). Kemudian ujung ekor akan dilepaskan dan juga memberikan sinyal untuk membuka *head tail* sehingga membuat DNA masuk ke dalam sitoplasma sel inang (Jakutyte *et al*, 2012). Ketika DNA telah memasuki sitoplasma, proses replikasi DNA dimulai.

Proses injeksi DNA pertama kali mungkin akan difasilitasi dengan degradasi peptidoglikan untuk membuat pintu masuk yang cukup besar untuk materi DNA yang diinjeksikan. Kemudian beberapa bakteriofag baru akan muncul dari sel inang yang lisis, dan bakteriofag tersebut memiliki ekor yang lengkap (Stockdale *et al*, 2013). Bakteriofag yang memiliki ekor lengkap dapat lebih baik menginfeksi sel inang dengan dinding sel yang banyak terdapat *cross-linking* (atau pada sel yang berada pada fase stasioner). Ini memberi informasi bahwa sifat adaptif bakteriofag pada produksi populasi yang heterogen meningkatkan kemampuan infeksi dari bakteriofag itu sendiri.

Replication

Proses replikasi DNA dimulai dengan membukanya rantai DNA kemudian ditemplei oleh ORI. *Origin of Replication* (ORI) memiliki fungsi untuk mengikat mesin replikasi pada sel inang dengan DNA bakteriofag dan memulai terjadinya sintesis DNA (Kreuzer and Brister, 2010). Demudian dengan bantuan enzim DNA polimerase, akan terjadi proses pemanjangan rantai DNA baru.

Packaging

Mekanisme pengemasan DNA pada bakteriofag BAL belum banyak dikarakterisasi secara detail (Morais, 2012). Namun, pada kebanyakan bakteriofag *non*-BAL, proses pengemasan DNA menjadi *procapsid* dimulai dengan "*packaging machinery complex*" (Morais, 2012). Proses ini menggunakan mekanisme *pac* atau *cos* yang telah dipaparkan oleh Murialdo, (1991). Terminase kecil akan menyadari keberadaan *pac site* dalam mengontrol terminase besar dan juga aktivitas ATPase selama translokasi DNA (Buttner *et al*, 2012). Kompleks DNA-terminase berinteraksi dengan portal protein, oligomer berbentuk siklik akan mengelilingi kanal dimana DNA masuk dan keluar dari kepala bakteriofag, untuk mentranslokasi DNA ke *procapsid* (Sun *et al*, 2008).

Assembly

Proses berkumpulnya struktur bakteriofag baru diawali dengan proses pembentukan banyak *capsid* protein utama (*major capsid protein*) dan dengan *scaffold* protein yang membentuk inti penstabil sampai DNA dikemas (Aksyuk dan Rossmann, 2011). *Procapsid* akan mengalami pematangan dan menjadi *capsid* bakteriofag dewasa. Sementara itu, ekor bakteriofag dibentuk dari complex yang terbentuk dari C-terminal TMP (*tape of main protein*) (Vegge *et al*, 2005). Penghubung kepala dan ekor bakteriofag terbuat dari *portal protein* sehingga diperoleh bakteriofag baru dengan struktur yang lengkap dari kepala hingga ekor (Pell *et al*, 2009).

Release

Setelah struktur bakteriofag lengkap, maka akan terjadi proses lisis pada sel inang sehingga bakteriofag baru akan tersebar ke lingkungan sekitar. Proses lisis dapat dicapai dengan bantuan 2 jenis protein, yaitu *holin* dan *lysin*. Protein *holin* berfungsi dengan menumpuk di dalam membran sel dan pada agregat titik waktu yang ditentukan secara genetik, secara spontan membentuk pori-pori atau lubang besar, cukup besar untuk memberikan akses lisin ke substratnya, dinding sel peptidoglikan (Wang *et al*, 2003). N-terminal dari lisin berfungsi untuk menurunkan ikatan tertentu dalam polimer peptidoglikan sehingga dapat mengkatalisis proses lisis (Salminen dan von Wright, 2004). Bersama, *holin* dan *lysin* berperan penting dalam pembentukan partikel bakteriofag baru, prosesnya bervariasi di antara bakteriofag yang berbeda, tergantung *latent periodnya* (waktu setelah infeksi sebelum bakteriofag baru di *release*). Misalnya, periode laten untuk bakteriofag *lactococal* berkisar antara 40 dan 90 menit, untuk bakteriofag *Leuconostoc* dan *S. thermophilus* berkisar antara 20 dan 40 menit, sedangkan bakteriofag *Lactobacillus* bervariasi antara 30 dan 100 menit (Dupuis dan Moineau, 2010).

Siklus lisogenik

Seperti disebutkan sebelumnya, bakteriofag tertentu dapat menjadi bagian ke dalam genom inang dan mereplikasi bersama dengan sel bakteri dalam suatu proses yang dikenal sebagai *lysogeny* (Gambar 2.1). Bakteriofag lisogenik tersebar luas di antara kultur starter susu dan dapat menimbulkan ancaman signifikan terhadap fermentasi proses. Modul *lysogeny*, sangat penting dalam rangka memasukan bakteriofag dan mempertahankan kondisi lisogenik, dan mengkode beberapa gen penting untuk proses ini. Fungsi enzim integrase adalah memfasilitasi rekombinasi khusus antara genom bakteriofag dan inang pada urutan sequen homolog spesifik, yaitu *attP* (*phage attachment site*) dan *attB* (*bacterial attachment site*) (Groth dan Calos, 2004). Setelah di siklus lisogenik, gen litik pada profag harus tetap ditekan untuk mencegah masuk ke dalam siklus litik. Penjagaan ini dikendalikan oleh mekanisme kontrol transkripsi, dengan sebagian besar bakteriofag BAL lisogenik memanfaatkan sistem represor / aktivator (García *et al.*, 1999). Pemahaman siklus litik dan lisogenik bakteriofag telah membantu dalam karakterisasi mekanisme resistensi bakteriofag dan berbagai tahapan siklus bakteriofag yang ditargetkan.

Kesimpulan

Bakteriofag merupakan salah satu kotaminan yang dapat merugikan dalam proses produksi *dairy product*. Diperlukan studi yang baik mengenai bagaimana suatu bakteriofag dapat menginfeksi bakteri sehingga dapat diperoleh cara penanganan yang tepat sesuai dengan karakteristik bakteriofagnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Aksyuk, A.A., Rossmann, M.G., 2011. Bacteriophage assembly. *Viruses* 3, 172–203.
- Büttner, C.R., Chechik, M., Ortiz-Lombardía, M., Smits, C., Ebong, I.O., Chechik, V., Jeschke, G., Dykeman, E., Benini, S., Robinson, C.V., 2012. Structural basis for DNA recognition and loading into a viral packaging motor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 811–816.
- Chibani-Chennoufi, Bruttin, S.A., Dillmann, M.L., Brüssow, H., 2004. Phagehost interaction: an ecological perspective. *J. Bacteriol.* 186, 3677–3686.
- Dupuis, M.È., Moineau, S., 2010. Genome organization and characterization of the virulent lactococcal phage 1358 and its similarities to *Listeria* phages. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1623–1632.
- García, P., Ladero, V., Alonso, J.C., Suárez, J.E., 1999. Cooperative interaction of CI protein regulates lysogeny of *Lactobacillus casei* by bacteriophage A2. *J. Virol.* 73, 3920–3929.
- Groth, A.C., Calos, M.P., 2004. Phage integrases: biology and applications. *J. Mol. Biol.* 335, 667–678.
- Jakutyte, L., Lurz, R., Baptista, C., Carballido-Lopez, R., São-José, C., Tavares, P., Daugelavicius, R., 2012. First steps of bacteriophage SPP1 entry into *Bacillus subtilis*. *Virology* 422, 425–434.
- Kreuzer, K.N., Brister, J.R., 2010. Initiation of bacteriophage T4 DNA replication and replication fork dynamics: a review in the *Virology* journal series on bacteriophage T4 and its relatives. *Virol. J.* 7, 358.
- Mahony, J., van Sinderen, D., 2014. Current taxonomy of phages infecting lactic acid bacteria. *Front. Microbiol.* 5, 7.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N.,

- Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103, 15611–15616.
- Moldovan, R., Chapman-McQuiston, E., Wu, X.L., 2007. On kinetics of phage adsorption. *Biophys. J.* 93, 303–315.
- Morais, M.C., 2012. *Viral molecular machines*. Springer, New York.
- Murialdo, H., 1991. Bacteriophage lambda DNA maturation and packaging. *Ann Rev Biochem* 60, 125–153.
- Pell, L.G., Liu, A., Edmonds, L., Donaldson, L.W., Howell, P.L., Davidson, A.R., 2009. The X-ray crystal structure of the phage λ tail terminator protein reveals the biologically relevant hexameric ring structure and demonstrates a conserved mechanism of tail termination among diverse long-tailed phages. *J. Mol. Biol.* 389, 938–951.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C., 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 3–16.
- Salminen, S., von Wright, A., 2004. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. CRC Press, Florida.
- Stockdale, S.R., Mahony, J., Courtin, P., Chapot-Chartier, M.P., van Pijkeren, J.P., Britton, R.A., Neve, H., Heller, K.J., Aideh, B., Vogensen, F.K., 2013. The lactococcal phages Tuc2009 and TP901-1 incorporate two alternate forms of their tail fiber into their virions for infection specialization. *J. Biol. Chem.* 288, 5581–5590.
- Sun, S., Kondabagil, K., Draper, B., Alam, T.I., Bowman, V.D., Zhang, Z., Hegde, S., Fokine, A., Rossmann, M.G., Rao, V.B., 2008. The structure of the phage T4 DNA packaging motor suggests a mechanism dependent on electrostatic forces. *Cell* 135, 1251–1262.
- Vegge, C.S., Brøndsted, L., Neve, H., Mc Grath, S., van Sinderen, D., Vogensen, F.K., 2005. Structural characterization and assembly of the distal tail structure of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *J. Bacteriol.* 187, 4187–4197.
- Wang, N., Deaton, J., Young, R., 2003. Sizing the holin lesion with an endolysin- β -galactosidase fusion. *J. Bacteriol.* 185, 779–787.
- Wang, S., Kong, J., Gao, C., Guo, T., Liu, X., 2010. Isolation and characterization of a novel virulent phage (ϕ ILdb) of *Lactobacillus delbrueckii*. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 22–27.

TOPIK 3

SUMBER KONTAMINASI FAG PADA FERMENTASI SUSU OLEH BAKTERI ASAM LAKTAT DAN CARA DETEKSI

(Efitras Adib Aziezhah - 17/414017/TP/11959)

Sumber kontaminasi fag pada produk fermentasi susu oleh bakteri asam laktat bisa berasal dari berbagai macam sumber. Hal tersebut perlu diketahui oleh industri fermentasi susu untuk mengurangi atau mencegah kontaminasi fag yang dapat mengganggu proses pengolahan fermentasi susu seperti menurunkan kualitas produk, banyak bahan yang bisa terbuang, tumbuhnya mikroorganisme patogen atau pembusuk yang pasti akan merugikan industri secara ekonomi (Fernandez *et al*, 2017). Sumber kontaminasi fag pada produk fermentasi susu berasal dari bahan mentah, bahan yang dipakai kembali atau diproses kembali, permukaan peralatan dan udara serta kultur bakteri yang digunakan untuk memfermentasi susu itu sendiri (Garneau *et al*, 2011).

Bahan mentah yang digunakan untuk membuat produk fermentasi susu tentunya adalah susu sapi yang kaya akan zat gizi yang merupakan sumber makanan bagi bakteri asam laktat yang dikenal bisa mengandung fag. Selain itu, bisa juga berasal dari bahan mentah alami lain yang digunakan dalam proses fermentasi susu, walaupun dalam jumlah yang sangat kecil. Susu mentah yang digunakan biasanya berasal dari berbagai peternak sapi yang dikumpulkan menjadi satu, memungkinkan adanya cemaran silang sehingga meningkatkan keberagaman jenis fag dalam penampung susu. Walaupun jumlahnya kecil, fag bisa menjadi sangat merugikan karena fag mampu dengan mudah berpropagasi dalam media cair seperti susu dan fag mampu menyebar pada media seperti gel, dengan hanya membutuhkan sedikit sel bakteri, fag dengan cepat dapat meningkat konsentrasinya di dalam media tersebut. Di Spanyol pernah terjadi temuan, bahwa terdeteksi ada 37% fag lactococcal dan streptococcal pada proses pembuatan yoghurt, sementara 9% dari sampel susu mentah yang diperoleh dari beberapa daerah di Spanyol terdeteksi mengandung fag *L. lactis*. Selain itu, jumlah fag yang berada pada *by-product* maupun produk jadi bisa lebih banyak karena fag mampu berpropagasi selama proses fermentasi berlangsung. Maka dari itu perlu dilakukan beberapa analisis dan tindakan untuk menghilangkan kontaminasi pada bahan mentah sebelum digunakan dalam proses fermentasi (Garneau *et al*, 2011).

Selain dari bahan mentah, kontaminasi fag juga bisa berasal dari bahan yang didaur ulang atau diproses kembali (*by-product*). Pada pembuatan produk fermentasi susu, protein *whey* digunakan kembali untuk beberapa tujuan, yaitu, meningkatkan citarasa dan tekstur dari produk jadi, untuk meningkatkan nilai gizi, serta standardisasi susu sebelum masuk ke dalam proses fermentasi, untuk meningkatkan yield. Fag akan terbawa protein *whey* (baik dalam bentuk cair maupun kering) dan mengontaminasi produk saat *whey* ditambahkan pada proses fermentasi. Ketika *whey* melewati membran ultrafiltrasi maupun mikrofiltrasi, fag akan tersaring dari *whey* atau susu, tetapi kemungkinan fag masih tetap ada pada produk dan mengganggu pada tahapan proses selanjutnya. Sehingga perlu dilakukan perlakuan untuk menginaktivasi fag atau *by-product* yang digunakan untuk proses fermentasi susu dengan kultur yang berbeda, misalnya *whey* pada pembuatan keju yang menggunakan kultur mesofilik aman digunakan untuk proses pembuatan yoghurt yang menggunakan kultur termofilik. Jika tidak dikontrol dengan baik, penggunaan *whey* sebagai salah satu komposisi pada pembuatan produk fermentasi susu sebagai substrat untuk kultur bakteri hidup, akan menyebabkan masalah yang serius pada lingkungan pembuatan fermentasi susu juga (Giraffa *et al*, 2018). Akan tetapi, penggunaan *whey* dari pabrik lain seperti ini juga memiliki resiko meningkatkan keberagaman jenis fag pada proses fermentasi susu (Garneau *et al*, 2011).

Kontaminasi fag juga bisa bersumber dari kultur bakteri yang digunakan untuk fermentasi susu itu sendiri. Ketika fag menginfeksi bakteri, fag bisa memperbanyak diri dimulai dengan siklus litik atau siklus lisogenik, dengan menyisipkan materi genetiknya ke dalam kromosom bakteri dan mengikuti replikasi bakteri. Ketika bakteri membawa profag, sel bakteri disebut lisogen. Bakteri bisa mengalami stress atau tertekan karena panas, kadar garam yang tinggi, senyawa antimikroorganisme, kekurangan nutrisi dan juga paparan sinar ultraviolet yang dapat mendorong profag untuk melakukan siklus litik. Sehingga ketika strain lisogenik digunakan sebagai *starter culture* memungkinkan terjadinya lisis sel bakteri selama proses fermentasi. Profag bisa dibawa oleh berbagai macam strain bakteri asam laktat dan seringnya lebih dari satu profag bisa ditemukan pada sebuah genome. Terlebih lagi, terungkap bahwa 25 dari 30 bakteri asam laktat yang sering digunakan dalam industri fermentasi susu seperti *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* dan *Lactobacillus rhamnosus* ditemukan membawa profag dalam selnya. Tentunya hal ini perlu menjadi perhatian bagi supplier kultur bakteri untuk melakukan test pada strain bakteri mereka, membawa profag atau tidak, dan menganalisis kecepatan induksi alami mereka. Keberadaan profag pada strain bakteri asam laktat yang digunakan sebagai *starter culture* tidak selalu buruk dan mengganggu proses fermentasi. Hal ini dibuktikan bahwa profag memiliki manfaat pada organoleptik produk keju melalui ekspresi gen yang menghasilkan endolisin yang menstimulasi autolisis dan mengeluarkan enzim intraseluler yang berperan dalam flavour. Selain itu gen profag bermanfaat dalam melindungi sel lactococci dan *S. thermophilus* dalam melawan infeksi dari fag yang lain. Profag juga berperan sebagai penampung gen virus lain dan berpartisipasi dalam rekombinasi dan rilis virus fag yang baru dengan memperluas rentang inang, contohnya propagasi fag baru pada strain yang membawa sifat resisten terhadap fag untuk mencegah mutan fag menjadi tidak sensitif terhadap sistem antifag (Garneau *et al*, 2011).

Udara dan permukaan peralatan yang terpapar udara menjadi salah satu sumber kontaminasi fag yang menyebabkan identifikasi terhadap rute fag dalam mencemari produk menjadi semakin sulit. Contoh pada pembuatan keju, kontaminasi oleh fag lactococcal seringnya berasal dari udara karena sangat jarang terjadi pada pembuatan keju. Konsentrasi cemaran fag melalui udara yang tinggi pada lingkungan menandakan kemungkinan berasal dari propagasi fag yang terjadi sebelumnya atau yang sedang terjadi. Dalam jumlah besar, susu yang diolah pada pabrik keju akan menghasilkan *whey* yang banyak dan memicu cairan *whey* terpercik dan terjadi pertukaran fag dari udara ke cairan. Selain itu, fag juga bisa berpindah dari udara ke permukaan cairan yang terkontaminasi dan diedarkan ke berbagai tempat di pabrik. Masalahnya belum ada standar yang ditetapkan mengenai prosedur untuk mendeteksi adanya cemaran fag dari udara yang mampu menyebar secara luas pada partikel ukuran yang sangat beragam, dari nanometer hingga mikrometer. Pengujian ini sangat penting, untuk mendeteksi adanya cemaran fag di udara lingkungan sekitar. Selain dari udara, sumber kontaminasi fag bisa berasal dari permukaan peralatan. Beberapa genome fag terdeteksi sangat tinggi konsentrasinya pada berbagai macam perlengkapan dan benda yang ditemukan pada pabrik keju seperti pada gagang pintu, lantai dan bahkan pada bahan pembersih. Walaupun belum diketahui dengan jelas bagaimana fag bisa berada di area perkantoran juga, kemungkinan hal ini bisa disebabkan karena orang yang keluar masuk area manufaktur dan perkantoran (Garneau *et al*, 2011). Dari berbagai sumber kontaminasi fag ini, diketahui bahwa praktik pembersihan dan Cara Pengolahan Pangan yang Baik (CPPB) atau biasa disebut dengan *Good Manufacturing Practices* (GMP) sangatlah penting untuk diperhatikan. Selain itu perlunya pelatihan bagi personal unruk menghindari kontaminasi silang fag antara bahan mentah dengan produk yang sudah diolah (Garneau *et al*, 2011).

Untuk mendeteksi adanya fag pada produk fermentasi susu, beberapa protokol dan cara sedang dikembangkan supaya efektif dalam mendeteksi adanya fag pada proses industri fermentasi susu. Metode deteksi tentunya harus memiliki sensitivitas tinggi, cepat, bisa diaplikasikan pada produk pangan, mudah dijalankan oleh teknisi dan biaya terjangkau (Giraffa *et al*, 2017). Metode mikrobiologis seperti analisis plak atau monitoring asidifikasi sudah lama menjadi standard utama pada deteksi fag, karena dapat menganalisis secara kuantitatif dan memiliki sensitivitas tinggi. Walaupun memakan waktu, metode tersebut menyediakan data yang sangat berguna seperti untuk mengetahui rentang inang fag. Tetapi peralatan baru mungkin dapat melengkapi metode mikrobiologis tersebut sehingga tidak diperlukan pertimbangan kembali akan spesifitas, kecepatan dan data mikrobiologi dari fag (Garneau *et al*, 2011).

Metode yang sering digunakan untuk mendeteksi fag yaitu menggunakan metode PCR. PCR merupakan metode deteksi yang selalu digunakan untuk deteksi atau secara cepat mampu mengklasifikasikan fag *Lactobacillus*, *Lactococcus*, dan *Streptococcus*. Metode ini bisa digunakan secara langsung pada sampel susu atau *whey* untuk mendeteksi keberadaan fag. Deteksi terendah yang pernah terdeteksi menggunakan metode klasikal PCR adalah 10^3 PFU/ml tetapi biasanya sangat bervariasi mulai dari 10^4 sampai 10^7 PFU/ml tergantung jenis fag dan sampel yang diuji. Metode amplifikasi fag menggunakan amplifikasi PCR dan migrasi gel membutuhkan waktu beberapa jam untuk menyelesaikannya.

Metode qPCR dapat menjadi pengganti metode PCR klasik karena bisa memonitoring replikasi gen fag yang spesifik selama proses fermentasi. Metode qPCR digunakan untuk mendeteksi keberadaan fag pada *Streptococcus thermophilus* dengan menggunakan pewarnaan yang berbeda dan primer khusus, misalnya, untuk target gen yang mengkode protein *tail* minor, seperti fag *pac-type* yang mengkode *receptor binding* protein pada fag *cos-type*. Hal yang sama juga dikembangkan untuk mendeteksi fag *Lactobacillus* dengan target gen yang menghasilkan endolisin. Metode qPCR mampu mendeteksi kontaminasi fag secara cepat, spesifik dengan sensitivitasnya yang tinggi. Meski begitu, metode PCR hanya bisa didesain jika sebelumnya sudah ada data genomik fag yang cukup (Garneau *et al*, 2011).

Metode kedua selain menggunakan PCR yaitu dengan *impedimetric monitoring*. Metode ini prinsipnya menggunakan biosensor untuk mendeteksi fag. Teknik ini berdasar pada kemampuan menempel ikatan fag-bakteri pada chip. Uji resonansi plasmon permukaan terdeteksi rendah seperti 10^2 coliphage/ml air limbah dan replikasinya dapat diikuti dengan *real time*. Pengujian tersebut kemudian dilakukan menggunakan uji impedimetry. Para penguji mengemukakan kemungkinan fag bisa terdeteksi menggunakan variasi hasil degradasi biofilm pada sampel susu. Tetapi metode ini memiliki beberapa batasan seperti: 1) inang bakteri harus membentuk biofilm pada chip; 2) hanya fag yang spesifik terhadap bakteri yang bisa terdeteksi; 3) teknik ini hanya bisa mendeteksi adanya atau tidaknya fag dan hal tersebut tidak menunjukkan secara kuantitatif.

Di sisi lain, deteksi pada fag menggunakan *microelectronics* membuka jalan untuk penemuan metode deteksi baru. Gracia-Aljaro dan kawan-kawan (2010) juga menemukan teknik mikroelektronik dimana biosensor-CNT (*carbon nanotube*) bisa mendeteksi perubahan arus yang terjadi. Biosensor-CNT pertamakali “difungsikan” (dengan penambahan *1-pyrene butanoic acid succinimidyl ester*) yang kemudian ditambah dengan antibodi spesifik fag atau bakteri. Fungsionalisasi sendiri (tanpa ada ikatan dengan antigen) menginduksi peningkatan resistensi yang menyebabkan penurunan arus. Ketika antigen seperti fag atau bakteri berikatan dengan antibodi yang terikat pada CNT, resistensinya semakin meningkat. Perbedaan antara resistensi awal (setelah difungsikan) dengan yang setelah terikat pada CNT

dikarenakan antigen yang berikatan dihitung dan dihubungkan dengan waktu inkubasi dan konsentrasi dari antigen. Semakin banyak antigen yang berikatan pada chip CNT, semakin besar pula resistensi sampai hampir mencapai *saturation stage*. Metode ini membuktikan akan lebih efektif digunakan pada fag daripada bakteri (mungkin karena ukurannya yang lebih kecil) yang artinya perubahan pada arus bisa diobservasi lebih cepat. Fag bisa terdeteksi pada konsentrasi minimum 10^3 PFU/ml hanya dalam 5 menit. Metode ini lebih menjanjikan karena bisa mendeteksi secara kuantitatif dan spesifitas yang mudah adaptasi karena dapat memilahkan antibodi. Sejak protein fag dikonservasi daripada sekuen DNA, antibodi bisa diseleksi untuk mendapatkan lebih dari 1 fag dalam 1 waktu. Karena fag yang beragam, beberapa antibodi akan dikembangkan untuk mendeteksi fag yang paling sering muncul (Garneau *et al*, 2011).

Metode terakhir yang digunakan untuk mendeteksi adanya fag adalah *flow cytometry*. *Flow cytometry* adalah teknik untuk mendeteksi dan mengukur karakteristik fisik dan kimia dari suatu sel atau partikel (Givan, 2011). Metode ini sudah sering digunakan beberapa tahun lalu untuk mendeteksi keberadaan virus di laut menggunakan jejak asam nukleat. Metode ini mampu meng-enumerasi fag bebas dalam sampel dengan efisien terlepas dari inangnya. Sebuah teknik baru, yang menggunakan *flow cytometry* juga didesain untuk menggabungkan spesifitas inang fag. Ketika fag menginfeksi inangnya, bakteri akan mengalami perubahan secara morfologi yang mengarah kepada lisis sel. Kehilangan masa dan gangguan pembelahan sel adalah hal yang dapat dimonitor dengan *flow cytometry*. Sel dengan kontras yang rendah bisa diamati dibawah mikroskop fase kontras saat fag lisis, hamburan cahaya pada *flow cytometer* dapat mengukur massa sel dengan efisien selama rantai bakteri (dalam kasus BAL) pertama kali pecah oleh getaran yang kuat. Sifat ini memungkinkan *flow cytometer* untuk membedakan sel yang terinfeksi dan tidak. Untuk menguji keberadaan fag, kultur harus bergerak dalam *flow cytometer* untuk mendistribusikan sel. Distribusi yang luas menandakan keberadaan sel yang mati maupun hidup sedangkan yang hidup biasanya akan memberi puncak yang sempit. Teknik ini memiliki kelebihan dapat mendeteksi perubahan morfologi sel terlepas dari strain, fag atau jumlah strain dalam kultur starter. Batas deteksi yang pernah dilaporkan adalah 10^5 PFU/ml, hal ini dapat dibandingkan dengan metode PCR klasikal. Perlu diketahui bahwa *flow cytometry* berhasil digunakan untuk mendeteksi perubahan morfologi bakteri yang terinfeksi fag dalam kultur yang diperkaya dengan susu skim, partikel seperti sel eukariot atau partikel lemak yang berpotensi memblokir *cytometer* perlu dihilangkan dahulu sebelum pengujian. Dari sudut pandang industri, *flow cytometer* bisa mendeteksi fag pada saat itu juga, tetapi membutuhkan perlengkapan yang mahal dan teknisi yang terlatih untuk melakukan pengujian dan menganalisis data (Garneau *et al*, 2011).

DAFTAR PUSTAKA

- Fernandez, Lucia; Escobedo, Susana; Guitierrez, Diana; Portilla, Silvia; Martinez, Beatriz; Gracia, Pilar and Rodriguez, Ana. 2017. Bacteriophages in the Dairy Environment: From Enemies to Allies-review. *Journal Antibiotics*, MDPI
- Garcia-Aljaro C, Cella LN, Shirale DJ, Park M, Munoz FJ, Yates MV, Mulchandani A. 2010. Carbon nanotubes-based chemiresistive biosensors for detection of microorganisms. *Biosens Bioelectron*, 26:1437-1441
- Garneau, Josiane E dan Moineau Sylvain. 2011. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. In *Microbial Cell Factories*. From 10th symposium on Lactic Acid Bacterium.

- Giraffa, Giorgio; Zago, Miriam and Carminati, Domenico. 2017. Lactic Acid Bacteria Bacteriophages in Dairy Products: Problems and Solutions. *In Microbiology in Dairy Processing: Challenges and Opportunities*. Lodi: John and Wiley & Sons Ltd and the Institute of Food Technologist.
- Givan, Alice L. (2011). "Flow Cytometry: An Introduction". In Hawley, T.; Hawley, R. (eds.). *Flow Cytometry Protocols*. Methods in Molecular Biology. **699**. Humana Press. pp. 1

TOPIK 4
CARA PENANGANAN KONTAMINASI FAG PADA FERMENTASI SUSU
OLEH BAKTERI ASAM LAKTAT
(Marcella Jessica - 17/414025/TP/11967)

Fag terdapat dalam jumlah yang banyak dan jenis yang beragam di masing-masing fasilitas fermentasi. Perlakuan terhadap fag lebih cenderung untuk mengontrol jumlahnya secara efisien daripada menghilangkan secara total (Garneau dan Moineau, 2011). Mencegah serangan fag adalah salah satu tantangan terbesar dalam fermentasi susu (Derkx, *et. al*, 2014). Infeksi fag menjadi penyebab lazim berkurangnya aktivitas *starter* dalam proses produksi keju dan susu fermentasi, menghasilkan fermentasi yang produksi asamnya berkurang, atau di kasus ekstrem, hingga fermentasi gagal. Fag sangat sulit untuk dieliminasi karena fag menyebar dengan sangat cepat di industri *dairy*. Oleh karena infeksi fag dapat menyebabkan kerugian secara ekonomi pada pabrik *dairy*, pengembangan tindakan pengontrolan menjadi penting (Guglielmotti *et. al*, 2012). Beberapa cara penanganan berikut dapat dilakukan untuk mengurangi resiko kegagalan pada fermentasi susu oleh BAL yang disebabkan oleh fag.

a. Sanitasi

Desain pabrik, *hygiene* yang cukup, pembersihan alat yang ketat dan terjadwal, serta aliran udara yang baik adalah faktor penting untuk mengurangi perkembang-biakan fag. Pertama, karyawan pabrik harus dilatih mengenai prosedur untuk mengontrol fag agar mereka dapat mengaplikasikannya dengan baik. Terkait desain pabrik, resiko kontaminasi silang dari media bakteri, produk antara, dan mesin pabrik harus diminimalkan, misalnya dengan menggunakan area produksi independen untuk setiap proses. Membatasi pembentukan bioaerosol dapat mengurangi sumber kontaminasi fag dari udara. Upaya lain adalah dengan menyaring udara menggunakan filter dan melakukan persiapan kultur *starter* pada ruangan bertekanan (Pujato *et. al*, 2019).

Pembersihan alat dan fasilitas dapat mengurangi sejumlah besar mikroorganisme, namun keberadaan BAL yang tersisa dapat meningkatkan resiko kontaminasi fag. Peran *sanitizer* adalah untuk membunuh mikroorganisme yang bertahan setelah prosedur pembersihan sehingga dapat mengurangi penyebaran fag di fasilitas fermentasi. *Sanitizer* yang efektif terhadap bakteri tidak selalu efisien dalam menginaktivasi fag (Fernández *et. al*, 2017). Beberapa jenis *sanitizer* sudah diuji pada beberapa fag BAL dengan berbagai faktor lingkungan (pH, waktu, suhu, dan lain-lain). Ditemukan bahwa asam perasetat adalah *sanitizer* paling efisien, sedangkan etanol dan isopropanol tidak begitu efektif. Selain itu, kombinasi penggunaan beberapa *sanitizer* juga telah diteliti terhadap fag dan ditemukan paling efektif saat digunakan pada konsentrasi tertentu. Pengaruh faktor lingkungan saat penggunaan *sanitizer* juga telah diteliti yaitu terkait dengan pH, ditemukan bahwa pH ekstrem, baik tinggi (pH>11) maupun rendah (pH<4), menunjukkan hasil paling baik (Garneau dan Moineau, 2011).

Beberapa *sanitizer* baru dengan kandungan kimia berbeda mulai memasuki pasar. Kebanyakan *sanitizer* tersebut sudah diuji terhadap bakteri, namun hanya sedikit data yang tersedia mengenai keefektifan terhadap fag dan faktor lingkungan yang mempengaruhi. Secara ideal, *sanitizer* yang baik harus digunakan pada konsentrasi yang efektif dengan memperhatikan biaya, memiliki tingkat aktivitas yang tinggi (kurang dari 2 menit untuk setidaknya 99% inaktivasi) dengan kehadiran bahan organik, dan memiliki aktivitas disinfeksi

terhadap berbagai fag. Beberapa *sanitizer* tertentu bahkan masih memiliki aktivitas yang tersisa walaupun telah dibersihkan. Dengan berkembangnya kepedulian terhadap lingkungan, *sanitizer* yang dipilih harus ramah lingkungan. Material yang digunakan di pabrik juga perlu diperhatikan karena beberapa *sanitizer* mungkin dapat berinteraksi dengan permukaan alat, seperti menyebabkan korosi (Garneau dan Moineau, 2011). Agar dapat disetujui penggunaannya, *sanitizer* yang kontak dengan makanan harus memenuhi beberapa kriteria, seperti level residu minimum, tingkat toksisitas rendah terhadap manusia, dan tingkat efikasi antimikroorganisme yang tinggi. Di Eropa, ada klaim *sanitizer* untuk reduksi fag BAL yang mengharuskan reduksi sebesar 4 log jumlah *plaque forming units* dengan waktu yang ditentukan (Campagna *et.al*, 2014). Penggunaan *sanitizer* harus selalu diuji secara reguler terhadap fag yang baru ditemukan karena terdapat variasi yang berbeda mengenai sifat resisten fag terhadap *sanitizer*. Bahkan satu jenis fag dapat memiliki sifat resisten terhadap lebih dari satu jenis *sanitizer*. Aplikasi *sanitizer* yang mengandung campuran senyawa dapat mengurangi masalah tersebut dalam kombinasi dengan perlakuan lain, seperti perlakuan panas dan tekanan tinggi. Selain itu, sebagai tindakan pencegahan munculnya populasi fag yang resisten, rotasi penggunaan *sanitizer* yang berbeda juga patut dipertimbangkan (Marcó *et. al*, 2019). Beberapa *sanitizer* yang mengandung campuran senyawa harus dipastikan tidak memberikan efek negatif terhadap produk akhir dan dapat terdegradasi menjadi senyawa akhir yang tidak berbahaya (Fernández *et. al*, 2017).

Cara lainnya untuk penanganan fag di industri secara sanitasi adalah sistem pengasapan, perlakuan ozon, dan iradiasi sinar UV, namun data yang tersedia mengenai efisiensi perlakuan tersebut terbatas (Garneau dan Moineau, 2011). *Photocatalysis* terbukti memiliki efisiensi dalam inaktivasi bakteri, spora, fungi, dan virus, pada kedua fase cair dan gas, sehingga teknologi ini mungkin dapat digunakan untuk mengurangi jumlah fag. *Photocatalysis* dapat mengeliminasi secara komplit 2 fag tipe 936 (CHD dan QF9) melalui pengeksposan radiasi UV-A selama 120 dan 60 menit secara berurutan. Radiasi UV-A memiliki keuntungan yaitu aman untuk digunakan sehingga memungkinkan dilakukannya aplikasi *photocatalysis* pada jangka waktu yang lama, bahkan dengan kehadiran karyawan pabrik (Fernández *et. al*, 2017). Pada penelitian lainnya, terbukti bahwa *photocatalysis* (iradiasi menggunakan UV-A dengan TiO₂ sebagai katalis) dapat menginaktivasi fag PL-1 pada *L. casei* menggunakan TiO₂ fase cair. Penelitian lebih lanjut menggunakan reaktor *photocatalytic* skala laboratorium membuktikan efisiensi *photocatalysis* dalam inaktivasi berbagai fag BAL ketika merangsang pembentukan bioaerosol. Baru-baru ini, reaktor *photocatalytic* skala semi pilot didesain untuk menginaktivasi fag yang terkandung dalam bioaerosol dan diperoleh pengurangan jumlah fag sebesar 2.7 log setelah 1 jam perlakuan *photocatalysis*. Perlakuan terhadap permukaan alat menggunakan iradiasi UV-C *nonionizing* juga diusulkan untuk mengurangi jumlah fag (Pujato *et. al*, 2019). Mode primer dari disinfeksi UV-C terjadi ketika asam nukleat mengabsorpsi UV-C dan membentuk *cross-linked pyrimidine dimers*. Dimer tersebut, ketika ada dalam jumlah yang cukup dan pada lokasi kritis, dapat menghambat perbaikan DNA dan mencegah organisme untuk bereplikasi. USFDA (*United States Food and Drug Administration*) telah menyimpulkan bahwa penggunaan UV-C pada 253.7 nm aman untuk proses pengolahan makanan dan lebih lanjut diakui sebagai perlakuan untuk mengurangi patogen dan mikroba lain (Gunter-Ward *et. al*, 2018).

b. Perlakuan bahan

Jumlah fag awal pada bahan yang digunakan untuk produk *dairy* perlu dikurangi sebanyak mungkin (Fernández et. al, 2017). Susu dan bahan derivative susu lainnya mungkin mengandung fag sehingga perlu diberi perlakuan untuk mengurangi jumlah fag tersebut. Bila memungkinkan, bahan atau media yang steril harus selalu digunakan (Garneau dan Moineau, 2011). Baru-baru ini, industri *dairy* menggunakan *recycled* whey protein dan whey fat untuk meningkatkan *yield* pada pembuatan keju atau menambah tekstur pada susu fermentasi. Penggunaan kembali bahan tersebut juga dapat meningkatkan resiko kontaminasi fag sehingga perlu dilakukan perlakuan pada bahan tersebut untuk mengurangi jumlah fag (Marcó et. al, 2019). Pada industri susu, proses pasteurisasi adalah perlakuan paling umum digunakan untuk mengurangi pertumbuhan bakteri dan mencegah pembusukan produk. Namun, beberapa fag terbukti resisten terhadap suhu pasteurisasi, yang lebih cenderung disebabkan oleh faktor fag, bukan faktor *host*. Pemanasan dapat sangat mengurangi aktivitas fag karena perubahan pada morfologi fag (Garneau dan Moineau, 2011). Fenomena yang sering diamati adalah terjadinya pelepasan DNA fag dari kapsid, terbelahnya fag menjadi bagian kepala dan ekor yang terpisah, dan agregasi dari ekor fag (Marcó et. al, 2019).

Parameter tertentu dikalkulasi untuk mengevaluasi kerentanan fag terhadap perlakuan panas. Salah satu parameter yang paling sering digunakan adalah T99, didefinisikan sebagai waktu untuk mencapai 99% inaktivasi fag, yang memungkinkan perkiraan yang baik dari resistensi fag terhadap perlakuan inaktivasi. Namun, parameter ini tidak mempertimbangkan destruksi fag secara total, melainkan inaktivasi dari 99% populasi fag dengan tingkat sensitivitas tinggi. Setelah perlakuan panas yang diterapkan terhadap sampel yang mengandung jumlah awal fag yang tinggi, fag yang tersisa dapat menggandakan diri dan mencapai jumlah yang bermasalah kembali. Dengan pertimbangan tersebut, waktu minimum yang diperlukan untuk inaktivasi fag secara komplit (dianggap ketika jumlah fag menjadi tidak terdeteksi pada sampel) juga menjadi parameter lain yang berguna. Waktu ini mungkin lebih lama dari waktu T99 dan secara ideal, kedua parameter ini harus ditentukan (Guglielmotti et. al, 2012).

Penelitian lainnya juga menilai efek perlakuan *dynamic high pressure* (DHP), *high hydrostatic pressure* (HHP), dan *high pressure homogenization* (HPH) terhadap fag. Seluruh penelitian tersebut melaporkan bahwa penggunaan setelah 5 siklus pada tekanan 100 MPa atau lebih terbukti mengurangi jumlah fag dari 2 log hingga 6 log. Untuk kedua perlakuan tersebut, ditemukan bahwa pengurangan jumlah fag sebanding dengan jumlah siklus dan tekanan yang digunakan, serta bervariasi secara signifikan tergantung pada media yang berbeda dan jenis fag. Perlu juga dipertimbangkan biaya penggunaan kedua perlakuan yang cukup tinggi (Pujato et. al, 2019). Ditemukan juga bahwa perlakuan panas dan tekanan tinggi memiliki efek sinergis yang menyebabkan penurunan jumlah fag lebih cepat. Namun, jika perlakuan tersebut dikombinasikan, perlu dipertimbangkan pengaruhnya terhadap sifat fungsional bahan yang penting bagi produk akhir, seperti tekstur dan flavor (Garneau dan Moineau, 2011). Teknologi baru lainnya yang tidak menggunakan panas adalah *pulsed electric field* (Fernández et. al, 2017).

Fag juga bereaksi secara berbeda tergantung dari media atau matriks makanan (susu, whey, susu bubuk, dan lain-lain). Telah banyak disebutkan bahwa susu mempunyai efek protektif karena kandungan proteinnya. Efek protektif dari protein susu memperkuat pertimbangan bahwa susu atau bahan mentah lainnya dapat menjadi potensi sumber kontaminasi fag sehingga perlu diberikan perlakuan. (Garneau dan Moineau, 2011). Telah

dikemukakan bahwa ada kemungkinan bahwa kasein yang bertanggung jawab terhadap meningkatnya resistensi termal pada fag (Guglielmotti et. al, 2012). Pada penelitian lain, disebutkan bahwa efek protektif WPC (*whey protein concentrates*) terhadap fag P1532 terbukti ada dan bergantung kepada pH dan durasi dari perlakuan panas. Efek protektif ini akan berkurang setelah perlakuan panas yang lebih lama dan pada kondisi asam. Protein yang bertanggung jawab terhadap efek protektif ini tidak hanya 1 protein WPC, namun setidaknya merupakan kombinasi dari 3 protein whey (BLG, BSA, dan LAC) (Geagea et. al, 2015). Selain itu, diamati bahwa kandungan garam atau karbohidrat pada media dapat meningkatkan inaktivasi fag oleh perlakuan panas. Sedangkan, konsentrasi lemak yang tinggi tidak meningkatkan resistensi fag terhadap panas. (Marcó et. al, 2019).

Perlakuan *spray drying* terhadap whey dan juga produk *dairy* lainnya disebutkan bermanfaat untuk mengurangi jumlah fag, namun tidak menjanjikan pengurangan yang efisien. Hal ini dikarenakan walaupun suhu inlet udara mencapai 180-200°C, air dapat menguap secara cepat dan menyebabkan penurunan suhu pada tetesan whey hingga 60°C atau lebih rendah. Selain itu, perlakuan ultrafiltrasi juga dapat menyaring fag pada membran standar 20 kDa karena fag memiliki ukuran lebih besar dari whey protein. Baru-baru ini, filtrasi pada *cheese whey* menggunakan tipe membran berbeda sedang diteliti untuk mengurangi jumlah fag tanpa mempengaruhi kandungan nutrisi produk. Penelitian tersebut menggunakan filtrasi berbasis membran dengan teknik *cross-flow* untuk memperoleh tingkat permeasi yang baik dari whey protein, namun juga menahan fag dalam jumlah banyak. Ditemukan bahwa *polyethersulfone membrane* dengan 300 kDa memberikan hasil paling baik. Morfologi fag baik bentuk dan ukuran tidak mempunyai efek yang jelas, namun dengan memberi perlakuan mekanis terhadap sel bakteri *host*, penahanan fag dapat ditingkatkan. Penelitian lain menggunakan mikrofiltrasi 0.1 mm membran *ceramic* dengan desain tubular dilakukan untuk menyaring *cheese whey* pada skala laboratorium dan *pilot plant*. Hasil yang diperoleh adalah gradien permeabilitas longitudinal pada sistem membran skala *pilot plant* memberi hasil terbaik dalam pengurangan fag (Pujato et. al, 2019).

c. Rotasi penggunaan starter

Rotasi penggunaan *strain starter* terdengar kuno, namun merupakan dasar dari sistem pengendalian fag yang efisien, seperti pada industri keju. Hal ini bertujuan untuk menghindari penggandaan berulang dari jenis fag yang sama selama proses fermentasi dilakukan berturut-turut (Garneau dan Moineau, 2011). Kebanyakan infeksi fag dapat dicegah dengan melakukan penggantian kultur ataupun sistem rotasi berdasarkan kelompok BAL dengan sensitivitas terhadap fag yang berbeda (Derkx, et. al, 2014). Rotasi ini masih perlu ditindaklanjuti untuk mendeteksi munculnya jenis fag baru. Jenis fag yang baru harus diidentifikasi dengan PCR, demikian juga dengan *host range* (uji mikrobiologis) untuk menyesuaikan prosedur rotasi. Identifikasi *host range* juga dapat membantu menemukan *strain* BAL yang paling sensitif terhadap fag pada kultur *starter*, sehingga mungkin berujung pada penggantian *strain* tersebut dengan yang lebih baik (Garneau dan Moineau, 2011). Baru-baru ini, identifikasi menggunakan metode *multiplex* PCR dengan dasar lokus genetik pada polisakarida dinding sel yang berfungsi sebagai reseptor fag untuk fag *lactococcal* banyak dikembangkan untuk memprediksi kerentanan fag dan membantu merancang skema rotasi yang cocok (Fernández et. al, 2017). Namun, rotasi *starter* tidak dapat dilakukan pada *strain* unik seperti probiotik. Penggunaan CRISPR diusulkan dapat menjadi solusi agar rotasi *starter* dapat dilakukan pada probiotik, asalkan genom tetap utuh di luar wilayah CRISPR (Pujato et. al, 2019).

d. Mekanisme anti-fag

Bakteri memiliki variasi mekanisme untuk menghadapi serangan berbagai jenis fag berbeda. Secara umum, BAL telah memiliki beberapa sistem untuk mengatasi infeksi, setiap sistem menargetkan tahap berbeda pada siklus multiplikasi fag, yaitu: i) mencegah adsorpsi fag; ii) menghalangi masuknya DNA fag; iii) memotong asam nukleat fag; iv) menggagalkan infeksi. Sistem tersebut kebanyakan dikode oleh plasmid sehingga dapat dipindahkan dari satu *strain* ke lainnya untuk meningkatkan resistensi bakteri (Garneau dan Moineau, 2011). Namun, isolasi dari BIM (*bacteriophage insensitive mutants*) yang muncul secara spontan adalah alternatif untuk memperoleh bakteri tanpa plasmid konjugatif dan tidak melibatkan manipulasi genetik apapun (Fernández et. al, 2017).

Peningkatan sifat resistensi fag di bakteri dengan teknik konjugasi sering diteliti, terutama pada *L. lactis*, karena kebanyakan sistem yang resisten terhadap fag terdapat pada plasmid. Resistensi fag pada *L. lactis* (CHCC1915 dan CHCC1916) dapat ditingkatkan dengan transfer secara konjugasi oleh plasmid resisten pCI1750 dari *L. lactis* UC653 yang mengandung sistem resisten AbiG. Mekanisme Abi ini dikode oleh 2 gen, *abiGi* dan *abiGii*, memberi resistensi terhadap fag spesies 936 dan resistensi parsial terhadap fag spesies c2. Untuk percobaan *mating*, *strain L. lactis* MG1363 (*lactose negative derivative*) yang memiliki plasmid resisten pCI1750 digunakan sebagai donor dan *strain transconjugants* dipilih dengan mengekspos *strain* terhadap fag yang menghambat resipien, diikuti dengan *plating* pada agar dengan indikator laktosa. *Strain transconjugants* dari CHCC1915 dan CHCC1916 terbukti bekerja dengan baik dan telah berada di pasaran selama lebih dari 20 tahun, walaupun masih ada beberapa fag yang telah diisolasi tidak dipengaruhi oleh sistem resisten AbiG (Derckx, et. al, 2014).

Sistem antifag yang natural telah dikembangkan, salah satunya adalah sistem CRISPR/Cas. CRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) *loci* ditemukan di genome berbagai spesies BAL, seperti *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, dan *L. salivarius*. CRISPR *loci* berkembang melalui penggabungan sekuens DNA pendek (*spacers*) yang umumnya berasal dari DNA dengan ekstra kromosom seperti sekuens fag atau plasmid diantara dua pengulangan palindromik sebagian. Transkrip CRISPR diproduksi dan dipotong diantara pengulangan tersebut oleh protein Cas (*CRISPR-associated*) dengan atau tanpa protein *host* untuk menghasilkan RNA yang lebih kecil. RNA tersebut dan protein Cas memandu dan memotong sekuens asam amino asing secara spesifik untuk memastikan pertahanan sel. Sistem yang sangat efisien ini dapat beradaptasi untuk mendapat resistensi terhadap fag (Garneau dan Moineau, 2011).

Sistem CRISPR-Cas adalah mekanisme pertahanan natural yang terdapat pada banyak prokariot yang menyebabkan proteksi sekuens-spesifik terhadap invasi asam nukleat asing. Respon imun ini bergantung pada pasangan basa komplemen antara *spacer* pada CRISPR (bentuk efektif crRNA) dengan *protospacer* yang cocok pada genom di *invader*. Sebagai contoh, penggunaan CRISPR-Cas diaplikasikan pada fag p2 *lactococcal* dengan menggunakan CRISPR-Cas9 pada *Streptococcus pyogenes* yang digunakan pada *host heterologous* untuk memodifikasi genom fag dengan fase litik. Penerapan penggunaan CRISPR-Cas9 yang telah diadaptasi dilakukan terhadap *prototype host L. lactis* MG1363 yang sensitif terhadap fag untuk memungkinkan melakukan modifikasi terhadap genom pada fag p2 (Lemay et. al, 2017).

Penggunaan CRISPR dapat memperpanjang jangka hidup *strain* industri yang berharga untuk digunakan sebagai kultur *starter* dalam jangka waktu yang lama. Bakteri yang resisten terhadap fag akibat CRISPR paling baik diaplikasikan secara berulang, melalui beberapa putaran dalam menyeleksi mutan CRISPR natural setelah terekspos terhadap fag yang relevan di industri. Fag yang digunakan di putaran berbeda harus diseleksi dari koleksi yang berbeda berdasarkan perbedaan *host range* dengan atau tanpa genotip. Varian CRISPR dapat segera diseleksi menggunakan PCR, menyeleksi mutan yang mempunyai *spacer* baru, dan dikehendaki memiliki sekuens yang homolog terhadap sekuens fag. Perolehan *spacer* CRISPR yang dilakukan secara berulang menyediakan varian dengan resistensi fag yang meningkat dalam hal berkurangnya tingkat sensitivitas fag (efisiensi *phage plaquing* berkurang) dan spektrum resistensi fag yang meluas (spektrum luas dari resistensi fag dari tipe fag yang berbeda). Secara kuantitatif, CRISPR menyediakan tingkat resistensi yang tinggi, hingga 6 *order* besaran pengurangan dalam efisiensi *plaquing* dari setiap *spacer*. Kemudian, beberapa varian CRISPR yang diisolasi dari putaran independen dari pengeksposan terhadap fag yang berulang dapat dikombinasi secara selektif pada skema rotasi *starter* untuk peningkatan jangka hidup *strain* industri secara optimal. Kombinasi *spacer* unik yang dihasilkan dari beberapa putaran berturut-turut dari seleksi mutan CRISPR dapat digunakan sebagai sistem penandaan genetik alami untuk *strain* yang dipilih. Alternatif secara alami ini juga dapat direplikasi *in vitro* secara artifisial melalui pendekatan rekayasa genetika yang akan menghasilkan sekuens *spacer* sintetik. Meskipun beberapa contoh dalam penelitian mengungkapkan kecenderungan untuk mutasi, delesi, dan kehilangan gen *cas* dari berbagai *CRISPR loci*, ada beberapa bukti lain yang mengindikasikan bahwa *spacer* CRISPR yang baru-baru ini diperoleh terbukti stabil pada percobaan *long-term*. Mutasi *absent ancillary* di tempat lain di genom, yang merupakan keuntungan mutan CRISPR yang resisten terhadap fag, adalah konservasi dari sifat fungsional yang menjadi permanen pada *strain* isogenik (Barrangou dan Horvath, 2012).

Sistem Abi (*Abortive infection*) menimbulkan sifat resistensi fag melalui kematian massal sel, juga adalah sistem anti-fag natural yang umum ditemukan di beberapa bakteri. Sistem Abi sangat bermacam-macam dan pada *Lactococcus* saja telah ditemukan 23 sistem. Karakteristik sistem Abi yang paling menarik adalah beberapa dapat berfungsi sebagai sistem toksin-antitoksin (TA). Sistem TA terdiri dari dua elemen yang secara ketat dikontrol oleh pengaturan: toksin dan anti- toksinnya yang menetralkan toksin tersebut. Gangguan keseimbangan terhadap kedua elemen tersebut dapat menyebabkan kematian sel bakteri. Mekanisme sistem Abi masih diteliti secara lanjut beserta kaitannya dengan sistem resistensi fag untuk pemanfaatan secara optimal. Penemuan sistem Abi paling baru adalah AbiV yang dikode dengan kromosom, berbeda dengan sistem Abi lainnya yang dikode plasmid. Sistem AbiV ini tidak aktif pada *strain L. lactis MG1363* namun dapat diaktivasi secara spontan dengan reorganisasi bagian promotor. AbiV juga dapat secara natural ditransfer dari *strain L. lactis* yang satu ke lainnya. Sekuens lengkap dari fag mutan yang tidak sensitif terhadap AbiV ditemukan adanya mutasi pada gen bernama *sav* dan polipeptidanya dinamakan SaV. Ekspresi berlebih dari SaV menyebabkan efek toksik yang cepat terhadap sel. Analisis dari mRNA dan protein fag memberi kesan bahwa AbiV menghalangi aktivasi dari transkripsi gen yang terlambat, mungkin karena penghambatan umum pada translasinya. Ditemukan bahwa SaV dan AbiV berada di homodimer dan secara kuat berinteraksi antara satu sama lain (Garneau dan Moineau, 2011).

Upaya untuk membuat mutan *Lactococcus lactis* yang resisten terhadap fag adalah penggunaan protein PIP (*Phage Infection Protein*). PIP dikode oleh gen *pip* dan merupakan

reseptor untuk fag *prolate-headed c2 species* dan diyakini juga digunakan oleh semua fag c2. Ketika berusaha menghasilkan *L. lactis* mutan yang resisten terhadap fag c2 menggunakan sistem integrasi pGhost9:ISS1, ditemukan bahwa mutan yang resisten tidak mengandung integrasi ISS1 pada gen pip. Sebagai gantinya, integrasi ditemukan pada gen yjaE yang mengkode protein yang tidak diketahui fungsinya. Gen yjaE hanya menunjukkan 22% ciri khas dengan gen pip dan diprediksi mengkode protein yang diduga *ABC-2-like* dengan 6 bagian *membrane-spanning* dengan terminal N- dan C- domain protein infeksi fag (IPR017500 dan IPR17501) dan beberapa ulangan heptad yang diperpanjang (TIGR03057). Meskipun yjaE memiliki domain dengan tingkat kemiripan tinggi terhadap domain infeksi fag pip, tingkat ciri khas yang rendah menunjukkan secara jelas bahwa YjaE adalah komponen selular yang unik. Penghasilan mutan dengan gen dirupsi mengkonfirmasi bahwa inaktivasi gen yjaE memberikan kemampuan resisten *strain* terhadap sejumlah fag spesies c2 dan juga 2 fag spesies 936. Fag yang membutuhkan YjaE untuk infeksi (CHPC3, CHPC24, CHL92, bil67) tidak dipengaruhi oleh dirupsi dari gen pip, dan fag yang membutuhkan protein PIP (CHPC180, c2) masih dapat menginfeksi mutan yjaE. Sehingga dua fag tipe c2 menggunakan reseptor yang berbeda, yaitu c2 menggunakan PIP dan bil67 menggunakan YjaE. Setelah mengisolasi 5 mutan *strain L. lactis* yang resisten terhadap fag secara spontan dengan mengekspos bakteri terhadap berbagai macam fag, ditemukan bahwa semua mutan yang resisten mengalami mutasi pada gen yjaE. Dari 21 mutan, ditemukan bahwa 18 *strain* memiliki nukleotida tunggal yang berubah sehingga mengeluarkan kodon stop prematur dari bagian *membrane-spanning* dan menyebabkan *truncated protein*. Tiga mutan tersisa mempunyai bagian yang hilang pada *membrane anchoring region*, region promotor, maupun *external loop*. Fag yang menggunakan reseptor YjaE belum diamati dalam mengatasi *strain* resisten yang kekurangan YjaE. Namun hal terpenting adalah inaktivasi gen yjaE tidak mempengaruhi profil asidifikasi dari *strain L. lactis* sehingga metode ini menjanjikan untuk menghasilkan kultur *starter* mutan yang resisten terhadap fag tanpa mempengaruhi aktivitas kultur (Derkx, et. al, 2014).

Upaya peningkatan resistensi pada *L. lactis* sebelumnya menggunakan reseptor belum dibuat untuk setiap fag yang menyerang *strain* tertentu. Cara yang memungkinkan untuk mengembangkan mutan yang sepenuhnya resisten adalah dengan menghapuskan replikasi DNA fag. Enzim timidilat sintase yang dikode oleh gen thyA penting untuk sintesis *de novo* dari dTTP. Oleh karena susu tidak mengandung timidin, maka replikasi DNA, termasuk DNA dari fag yang menginfeksi, dihapuskan pada mutan thyA. *L. lactis MBP71*, mutan thyA dari *L. lactis CHCC3373* dengan delesi 42-bp di awal gen thyA menunjukkan resisten secara penuh terhadap 9 fag dari spesies 936 dan P335. *Strain* mutan thyA masih dapat mensintesis RNA dan juga protein sehingga metabolisme *strain* masih dapat aktif. Oleh karena tidak terjadinya pembelahan sel, diperlukan penambahan jumlah inokulasi untuk mencapai aktivitas asidifikasi yang mirip dengan *strain* sebelum dimutasi. *Strain* mutan MBP71 diciptakan menggunakan teknologi rekombinan DNA dan secara eksklusif digunakan sebagai bukti konsep. Mutagenesis dan seleksi untuk *pyrimidine auxotrophy* ini selanjutnya digunakan untuk mendapatkan varian dari *strain* industri *L. lactis* dan *S. thermophilus* yang cocok untuk dimasukkan dalam kultur *starter*. Belum ditemukan adanya varian fag yang dapat mengatasi mekanisme resisten ini (Derkx, et. al, 2014).

Penemuan mekanisme anti-fag lain juga ditemukan di bakteri dan archaeobakteri, seperti BREX, *prokaryotic Argonautes*, dan DISARM (Pujato et. al, 2019). Walaupun terdapat banyak penelitian tentang mekanisme anti-fag yang natural, penggunaan bakteri resisten-fag di industri akan berujung pada munculnya mutan fag yang dapat mengatasi sistem resistensi tersebut. Hal ini dikarenakan sifat fag yang memiliki kemampuan adaptasi tinggi dan

beragamnya jenis fag (Derkx, *et. al*, 2014). Penelitian perlu dilanjutkan agar tetap berada di satu langkah lebih awal dari evolusi fag. Interaksi antara *host* dengan fag dapat membuka cara baru dalam menemukan mekanisme anti-fag yang berguna pada fasilitas fermentasi. Sebagai contoh, baru-baru ini ditemukan bahwa fag pada *strain L. lactis MG1363* ditutupi oleh pelikel polisakarida yang melindungi sel dari fagositosis *host*, namun juga memegang peran penting dalam interaksi antara fag dengan *host*. Inaktivasi pelikel tersebut memberikan perlawanan terhadap fag *936-like* namun juga berujung pada pembentukan rantai panjang *cocci* yang tidak normal (Garneau dan Moineau, 2011).

Penelitian tentang bakteri mutan yang memiliki sifat resistensi terhadap fag juga menuntun pada ditemukannya protein baru yang berinteraksi dengan fag. Sebagai contoh, *Roseobacter denitrificans* mutan yang secara natural memiliki resistensi terhadap fag mengurangi ekspresi dari 5 membran protein dan meningkatkan ekspresi dari beberapa protein luar membran. Contoh lain adalah didapatkannya sifat resistensi terhadap fag pada *Staphylococcus aureus* memodifikasi sifat fisiologis sel dan menghasilkan berkurangnya ekspresi gen virulen. Tambahan lain yaitu fag T4 beradaptasi terhadap fase pertumbuhan *host*-nya, sehingga menghasilkan subpopulasi fag yang berbeda pada hasil lisis sel. Penelitian lain mengamati bahwa kultur *E. coli* yang kelaparan mempunyai fenotipe resistensi terhadap fag yang berbeda dari kultur yang tidak kelaparan. Penyaringan genetik terbaru skala genom menemukan bahwa fag *E. coli lambda* bersifat bergantung terhadap *host*. Gen 57 *E. coli* yang setengahnya sebelumnya tidak dikaitkan dengan infeksi fag ternyata ketika disingkirkan dapat menghambat kemampuan fag *lambda* untuk bereplikasi. Hasil-hasil tersebut membuktikan bahwa hubungan antara *host* dan fag sangat kuat (Garneau dan Moineau, 2011).

e. Komponen penghambat fag

Penggunaan media yang mengandung *chelating agents*, seperti sodium polifosfat dan peptida fag yang telah dipurifikasi, dapat menghambat fag dalam adsorpsi dan propagasinya (Pujato *et. al*, 2019). Penggunaan media tersebut dikembangkan untuk pembiakan *starter* pada industri *dairy*. Penambahan *chelating agents* tersebut dapat melindungi dari infeksi fag lebih lanjut (Fernández *et. al*, 2017).

Komponen yang berbeda dapat ditambahkan untuk menciptakan media penghambat fag dengan efisiensi yang bervariasi. Peptida dipurifikasi yang diisolasi dari fag *lactococcal* dan ditambahkan ke kultur dapat sedikit memperpanjang pertumbuhan kultur di susu, namun tidak dapat menginaktivasi fag. Multiplikasi dari beberapa fag BAL juga ditemukan bergantung kepada kalsium. Penggunaan fosfat yang dapat mengikat kation bivalen dihipotesiskan untuk mengurangi sifat infeksi fag. Namun, hasil menunjukkan bahwa penggunaan fosfat di susu pada konsentrasi yang tidak mempengaruhi stabilitas kasein tidak cukup untuk mengurangi sifat infeksi dari semua fag yang diuji (Garneau dan Moineau, 2011).

Upaya untuk mengurangi fag secara efektif yang telah dipelajari adalah dengan menambahkan beberapa komponen muatan positif seperti CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) pada fag c2 strain *Lactococcus*. Efek antiviral bergantung kepada fag dan struktur dari komponen kationik yang ditambahkan. Setelah 1 menit kontak CTAB 0.125 mM, populasi fag c2 berkurang dari 6 menjadi 1.5 log (pfu)/ml dan diinaktivasi secara komplit pada konsentrasi CTAB 1 mM. Namun, aktivitas antivirus CTAB terganggu pada pH asam dan dengan bertambahnya konsentrasi ionik. CTAB memiliki interaksi elektrostatik dengan fag pada pH 7. Namun, pada pH yang asam, seperti pH 3, fag memiliki muatan netral atau positif sehingga mengurangi absorpsi komponen kationik CTAB ke dalam fag. Sedangkan, jika

konsentrasi ionik bertambah dalam medium, komponen negatif lain akan berinteraksi secara kompetitif dengan komponen kationik CTAB sehingga CTAB tidak berikatan dengan fag (Chatain-Ly *et. al*, 2013).

Teknik pendekatan GMO (*genetically modified organisms*) juga dilakukan. Walaupun karena peraturan dan keinginan konsumen, aplikasi produk GMO terhadap industri *dairy* sulit untuk dilakukan (Fernández *et. al*, 2017). Salah satunya dengan melihat kapasitas dari antibodi (baik disekresikan, maupun disisipkan) yang menargetkan fag dan kemudian diuji di sampel produk *dairy*. Gen untuk mengkode dua protein pengikat antigen berbeda dikloning dan dimasukkan ke *L. paracasei*. Saat diekspresikan di media, antibodi yang disisipkan tersebut dapat menargetkan protein kapsid utama pada fag dan menginaktivasi 31% fag yang ditambahkan ke media. Laju inaktivasi bertambah menjadi 86% saat digunakan antibodi yang disekresikan untuk menargetkan protein pengikat reseptor (Garneau dan Moineau, 2011).

Contoh *strain* yang diperoleh dari teknik rekayasa genetika lainnya adalah dengan menggunakan kloning dari origin replikasi, teknologi antisense RNA, sistem yang memicu proses *suicide fag*, overproduksi dari protein fag, netralisasi fragmen antibody, dan DARPins (Fernández *et. al*, 2017). Penggunaan DARPins (*designed ankyrin repeat proteins*) diteliti untuk mengidentifikasi protein pengikat fag yang spesifik. DARPins bermanfaat karena dapat diekspresikan pada konsentrasi tinggi dan sangat stabil. Beberapa DARPins yang mengikat secara spesifik dengan ujung protein pengikat reseptor dari fag *lactococcal* diseleksi. Infeksi fag pada sel *Lactococcus lactis* dihambat oleh setiap DARPins dari tiga jenis yang dipilih (Garneau dan Moineau, 2011).

DAFTAR PUSTAKA

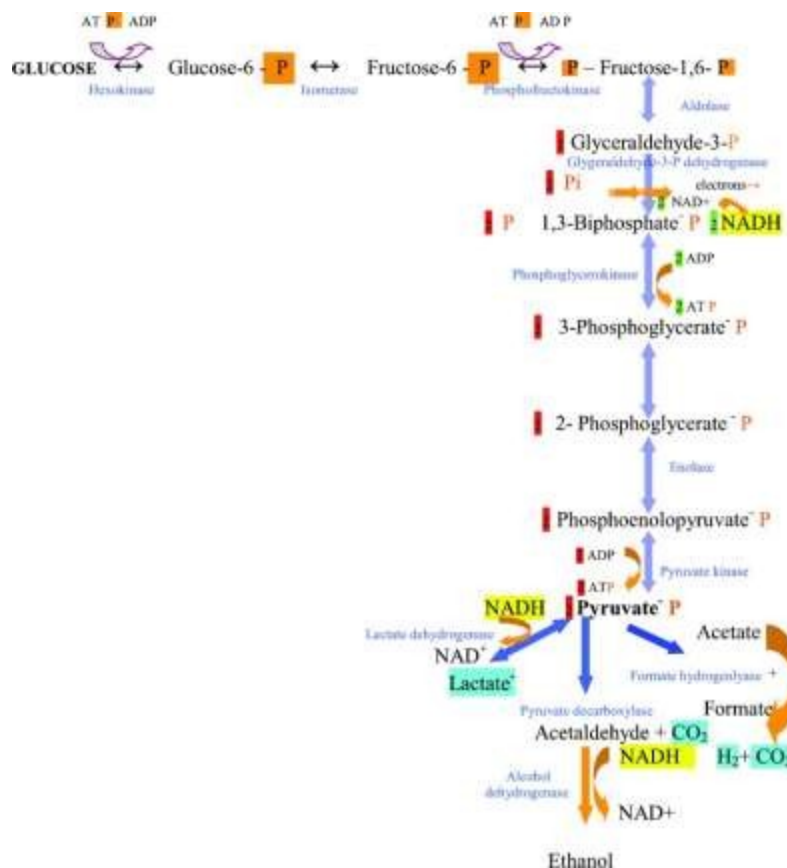
- Barrangou, R., dan Horvath, P. (2012). CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annual review of food science and technology*, 3, 143-162.
- Campagna, C., Villion, M., Labrie, S. J., Duchaine, C., dan Moineau, S. (2014). Inactivation of dairy bacteriophages by commercial sanitizers and disinfectants. *International journal of food microbiology*, 171, 41-47.
- Chatain-Ly, M. H., Moussaoui, S., Rigobello, V., Demarigny, Y., dan Vera, A. (2013). Antiviral effect of cationic compounds on bacteriophages. *Frontiers in microbiology*, 4, 46.
- Derkx, P. M., Janzen, T., Sørensen, K. I., Christensen, J. E., Stuer-Lauridsen, B., dan Johansen, E. (2014). The art of strain improvement of industrial lactic acid bacteria without the use of recombinant DNA technology. In *Microbial cell factories* (Vol. 13, No. 1, p. S5). BioMed Central.
- Fernández, L., Escobedo, S., Gutiérrez, D., Portilla, S., Martínez, B., García, P., dan Rodríguez, A. (2017). Bacteriophages in the dairy environment: From enemies to allies. *Antibiotics*, 6(4), 27.
- Garneau, J. E. dan Moineau, S. (2011). Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. In *Microbial cell factories* (Vol. 10, No. S1, p. S20). BioMed Central.
- Geagea, H., Gomaa, A. I., Remondetto, G., Moineau, S., dan Subirade, M. (2015). Investigation of the protective effect of whey proteins on lactococcal phages during heat treatment at various pH. *International journal of food microbiology*, 210, 33-41.
- Guglielmotti, D. M., Mercanti, D. J., Reinheimer, J. A., dan Quiberoni, A. D. L. (2012). Efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Frontiers in microbiology*, 2, 282.

- Gunter-Ward, D. M., Patras, A., S. Bhullar, M., Kilonzo-Nthenge, A., Pokharel, B., dan Sasges, M. (2018). Efficacy of ultraviolet (UVC) light in reducing foodborne pathogens and model viruses in skim milk. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), e13485.
- Lemay, M. L., Tremblay, D. M., dan Moineau, S. (2017). Genome engineering of virulent lactococcal phages using CRISPR-Cas9. *ACS synthetic biology*, 6(7), 1351-1358.
- Marcó, M. B., Suárez, V. B., Quiberoni, A., dan Pujato, S. A. (2019). Inactivation of Dairy Bacteriophages by Thermal and Chemical Treatments. *Viruses*, 11(5), 480.
- Pujato, S. A., Quiberoni, A., dan Mercanti, D. J. (2019). Bacteriophages on dairy foods. *Journal of applied microbiology*, 126(1), 14-30.

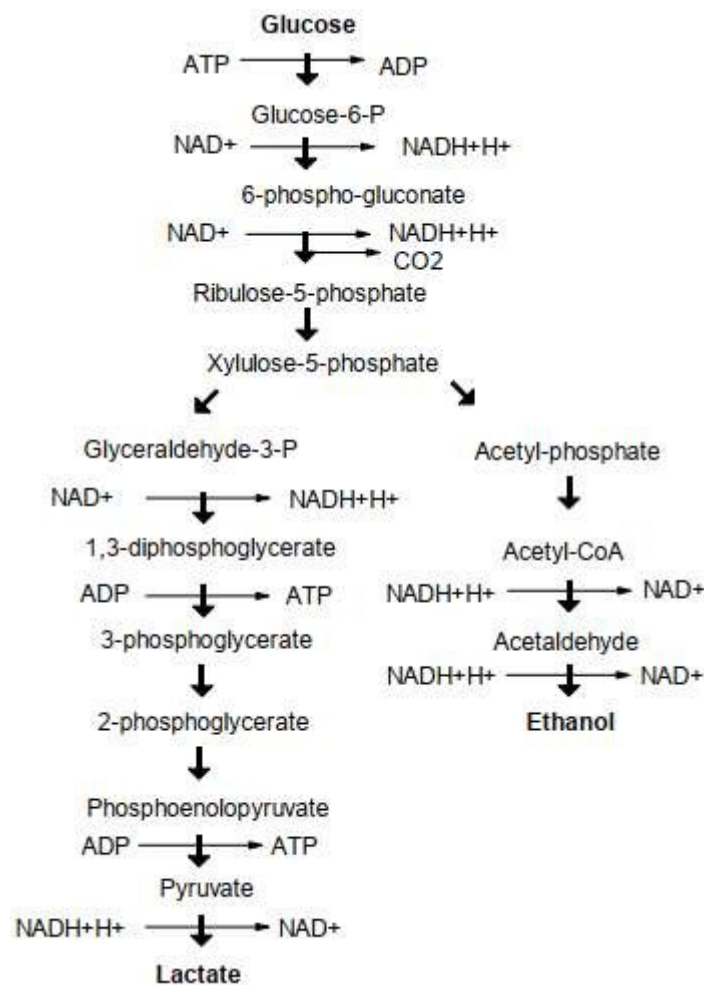
TOPIK 5
Rekayasa Metabolisme pada Bakteri Asam Laktat
 (Kevin Kusuma Lie - 17/414024/TP/11966)

Bakteri Asam Laktat, atau biasa disingkat BAL, merupakan bakteri yang menghasilkan asam laktat sebagai metabolit utama. Bakteri jenis ini banyak dimanfaatkan dalam industri makanan fermentasi. Selain digunakan dalam industri pangan, BAL juga dimanfaatkan dalam produksi asam laktat; metabolit lain juga bermanfaat dalam hal pengembangan citarasa (*flavor*), tekstur, produk probiotik, sintesis peptida yang memiliki sifat antimikroorganisme. Dengan karakteristik memiliki metabolisme energi dan metabolisme karbon yang sederhana serta memiliki materi genetik yang tergolong kecil (2-3Mb), BAL merupakan mikroorganisme yang berpotensi untuk dilakukan rekayasa metabolismenya agar menghasilkan produk yang diinginkan dengan lebih efisien. Salah satu cara yang telah dikembangkan untuk mengembangkan jalur metabolisme BAL adalah dengan mengubah jalur metabolisme asam piruvat sehingga dihasilkan produk akhir seperti pemanis buatan, citarasa (*flavor*), senyawa aroma, dan melalui jalur biosintesis yang lebih kompleks dapat dihasilkan eksopolisakarida dan vitamin melalui proses fermentasi (Kleerebezem, *et al.*, 2000)

Bakteri Asam Laktat memproduksi ATP atau energi melalui fermentasi karbohidrat disertai dengan fosforilasi di tingkat substrat. Terdapat 2 jalur utama metabolisme untuk heksosa (gula dengan 6 karbon) adalah glikolisis (Embden-Meyerhof *pathway*) dan fosfoketolase. Jalur glikolisis memiliki produk akhir utama berupa asam laktat (homofermentatif). Berikut ini jalur glikolisis yang terjadi pada BAL (Papagianni, 2012):



Sedangkan jalur fosfoketolase memiliki produk akhir berupa asam asetat, asam propionat, CO₂, etanol, dan beberapa senyawa lain selain asam laktat (heterofermentatif). Berikut ini jalur fosfoketolase yang terjadi pada BAL (Papagianni, 2012):



Lactococcus lactis, sebagai salah satu mikroorganisme yang tergolong dalam BAL, memiliki jalur glikolisis homofermentatif, sebanyak 90% gula diubah menjadi asam laktat sebagai produk akhir utama. Asam laktat banyak digunakan untuk pengawetan (sebagai *acidifier*) serta *flavor enhancer* dalam bidang pangan, selain itu juga digunakan sebagai *emulsifier* dan senyawa pelembab di bidang kosmetik, dan juga banyak digunakan dalam bidang farmasi (Kandler, 1983). L-asam laktat juga dapat digunakan untuk sintesis biopolimer, serta asam polilaktat juga digunakan untuk menggantikan beragam senyawa polimer yang sebelumnya didapat dari turunan minyak bumi. Hal ini menjadi salah satu penyebab meningkatnya permintaan asam laktat secara masif (Never, *et al.*, 2002).

Target utama dari rekayasa metabolisme adalah untuk meningkatkan produksi asam laktat, khususnya dalam hal penggunaan gula, jalur glikolisis, aliran asam laktat. Salah satu enzim yang berperan penting dalam mengatur laju glikolisis yaitu enzim fosfofruktokinase (PFK), karena jika didapati penurunan aktivitas enzim fosfofruktokinase akan diikuti dengan penurunan laju glikolisis. Selain daripada itu, laju glikolisis sebagian besar dipengaruhi oleh proses diluar glikolisis itu sendiri, seperti transpor gula, konsumsi ATP, serta sifat alosterik yang dimiliki oleh enzim fosfruktokinase memiliki andil yang signifikan dalam pengaturan laju

glikolisis. Pada *Lactococcus lactis* yang telah direkayasa sehingga aktivitas enzim fosfofruktokinase meningkat, dengan melakukan kloning pada gen *pfkA* dari *Aspergillus niger* atau gen *pfk13* yang telah dipotong sehingga mengkode fragmen PFK yang lebih pendek, didapat peningkatan konsumsi gula (dari 0,8 menjadi 1,7 mmol s⁻¹ g CDW) dan pembentukan asam laktat (dari 15 menjadi 22,8 g laktat (g CDW)⁻¹ h⁻¹) seiring dengan terjadinya peningkatan aktivitas enzim fosfofruktokinase dari 7,1 menjadi 14,5 U/OD₆₀₀ (Papagianni, *et al.*, 2009). Enzim laktat dehidrogenase (LDH) adalah enzim terakhir dalam jalur konversi gula menjadi asam laktat pada *Lactococcus lactis*, sehingga ketika terjadi kerusakan pada gen *ldh* akan mengakibatkan terjadinya peningkatan berbagai macam asam organik sebagai produk akhir. Tetapi pada *wild-type Lactococcus lactis* tidak menunjukkan peningkatan produksi asam laktat ketika aktivitas enzim laktat dehidrogenase ditingkatkan hingga 113% (Andersen, *et al.*, 2001).

Asam laktat yang diproduksi dapat memiliki struktur isomer L- maupun D-. Struktur isomer L-asam laktat lebih banyak dibutuhkan dalam bidang pangan, farmasi, dan juga sebagai monomer dari sintesis biopolimer. Sedangkan struktur isomer D- bersifat toksin bagi manusia. Sehingga rekayasa metabolisme BAL yang dilakukan berfokus pada jalur produksi L-asam laktat secara homofermentatif. Untuk menghasilkan asam laktat dengan struktur isomer L-, perlu dilakukan inaktivasi pada enzim yang berperan untuk mengubah struktur isomer asam laktat menjadi D-asam laktat, yaitu enzim *D-lactate dehydrogenase*. Inaktivasi terhadap enzim tersebut dilakukan dengan cara inaktivasi pada gen yang mengkode enzim tersebut yaitu gen *ldhD* dengan metode *chromosomal integration*, yaitu dengan menyisipkan fragmen gen untuk menghentikan transkripsi di tengah gen *ldhD* sehingga enzim tersebut tidak bisa tersintesis dengan benar (Bhowmik & Steele, 1994). Inaktivasi enzim *D-lactate dehydrogenase* dengan metode *chromosomal integration* pernah dilakukan pada *Lactobacillus helveticus wild-type strain* dan didapat hasil akhir metabolisme *Lactobacillus helveticus* tersebut murni L-asam laktat. Jika dibandingkan antara *Lactobacillus helveticus* dengan gen *ldhD* yang masih aktif dengan *Lactobacillus helveticus* yang telah diinaktivasi gen *ldhD*-nya, didapat peningkatan produksi L-asam laktat sebesar 20% pada *Lactobacillus helveticus* yang telah diinaktivasi gen *ldhD*-nya (Kyla-Nikkila K, *et al.*, 2000). Hal yang sama juga terjadi pada *Lactobacillus johnsonii* ketika dilakukan inaktivasi pada gen *ldhD*-nya. Upaya yang pernah dilakukan untuk meningkatkan produksi L-asam laktat yaitu dengan meningkatkan ekspresi dari gen *ldhL* yang mengkode enzim *L-lactate dehydrogenase* pada *Lactobacillus plantarum*, tetapi tidak didapat peningkatan produksi L-asam laktat yang signifikan (Ferain, *et al.*, 1994). Selain itu juga pernah dilakukan upaya peningkatan pada *Lactococcus lactis* dengan memperbanyak jumlah gen *las* operon yang merupakan bagiandari gen *pfk*, termasuk piruvat kinase (*pyk*) dan gen *ldhL*, tetapi didapat hanya sedikit peningkatan L-asam laktat yang dihasilkan (Davidson, *et al.*, 1995). Juga pernah dilakukan upaya peningkatan produksi L-asam laktat dengan cara mutasi pada *Lactococcus lactis* dengan sinar UV dan berhasil meningkatkan produksi L-asam laktat dengan mengurangi aktivitas NADH oksidase dan meningkatkan tingkat konsumsi gula (Bai, *et al.*, 2004).

DAFTAR PUSTAKA

- Andersen, H., Pedersen, M., Hammer, K. & Jensen, P., 2001. Lactate Dehydrogenase Has No Control on Lactate Production But Has Strong Negative Control on Formate Production in *Lactococcus lactis*. *European Journal of Biochemistry*, Volume 268, pp. 6379-6389.

- Bai, D., Zhao, X., Li, X. & Xu, S., 2004. Strain Improvement and Metabolic Flux Analysis in The Wild-Type and a Mutant *Lactobacillus lactis* Strain for L(+)-Lactic Acid Production. *Biotechnology Bioengineering*, Volume 88, pp. 681-689.
- Bhowmik, T. & Steele, J., 1994. Cloning, Characterization, and Insertional Inactivation of the *Lactobacillus helveticus* D(-) Lactate Dehydrogenase Gene. *Applied Microbiology Biotechnology*, Volume 41, pp. 432-439.
- Davidson, B. *et al.*, 1995. Current Research on The Genetics of Lactic Acid Production in Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal*, Volume 5, pp. 763-784.
- Ferain, T. *et al.*, 1994. *Lactobacillus plantarum* IdhL Gene: Overexpression and Deletion. *Journal of Bacteriology*, Volume 176, pp. 596-601.
- Kandler, O., 1983. Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, Volume 49, pp. 209-224.
- Kleerebezem, M., Hols, P. & Hugenholtz, J., 2000. Lactic Acid Bacteria as a Cell Factory: Rerouting of Carbon Metabolism in *Lactococcus lactis* by Metabolic Engineering. *Enz Microbial Technol*, Volume 26, pp. 840-848.
- Kyla-Nikkila K, Hujanen, M., Leisola, M. & Palva, A., 2000. Metabolic Engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for Production of Pure-(+)-Lactic Acid. *Applied Environmental Microbiology*, Volume 66, pp. 3835-3841.
- Never, A. *et al.*, 2002. Effect of Different NADH Oxidase Levels on Glucose Metabolism of *Lactococcus lactis* Kinetics of Intracellular Metabolite Pools by in Vivo NMR. *Appl Environ Microbiol*, Volume 68, pp. 6332-6342.
- Papagianni, M., 2012. Metabolic Engineering of Lactic Acid Bacteria for The Production of Industrially Important Compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4), p. e201210003.
- Papagianni, M., Avramidis, N. & Filiou, G., 2009. *Improving The Carbon Conversion Rate in Lactococcus lactis. Cloning Strategies..* London: World Scientific.

TOPIK 6
PEMBENTUKAN FLAVOR OLEH BAKTERI ASAM LAKTAT
(Ivan Felix Tandela - 17/414022/TP/11964)

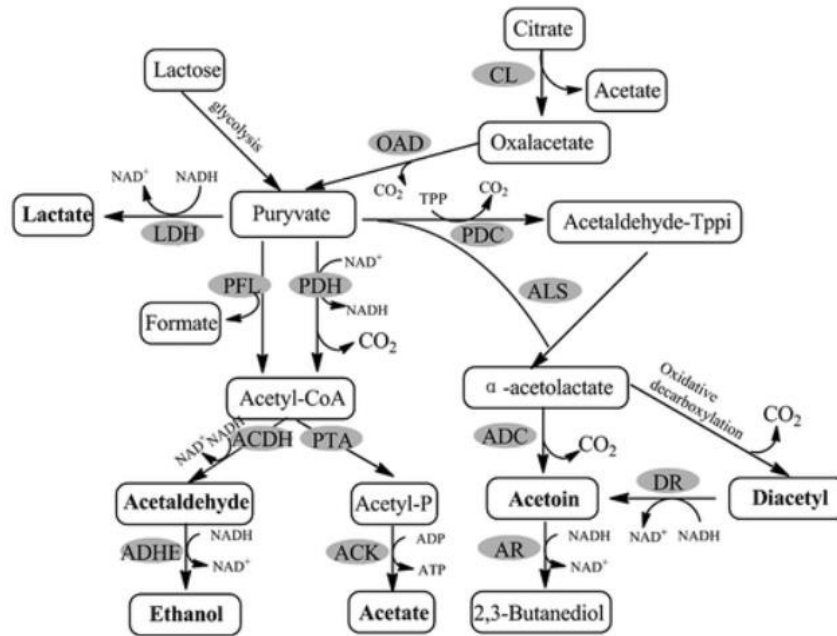
Bakteri asam laktat sudah banyak digunakan dalam pembuatan makanan atau minuman fermentasi dari produk susu. Selain dalam produksi makanan tersebut, bakteri asam laktat juga digunakan dalam berbagai aplikasi di industri seperti dalam produksi asam laktat, metabolit bernilai tinggi yang berperan dalam pengembangan flavor dan tekstur, selain itu juga diaplikasikan dalam bidang kesehatan, produksi produk probiotik dan produksi peptida yang mempunyai sifat antimikrobia (Kleerebezem *et al.*, 2000; Smid *et al.*, 2005). Bakteri asam laktat dapat menghasilkan ATP dengan melakukan fermentasi pada karbohidrat dengan beberapa jalur yang menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir utama (Kandler, 1983). Dalam industri makanan, asam laktat biasanya digunakan sebagai pengawet, pengasam, dan agen untuk meningkatkan flavor (van Maris *et al.*, 2004).

Salah satu penentu kualitas dari sebuah produk fermentasi dapat dilihat dari persepsi sensori. Persepsi sensori sendiri merupakan sebuah proses yang sangat kompleks, yang dipengaruhi oleh banyak faktor, seperti komponen flavor yang terdapat di dalamnya. Pada produk fermentasi seperti keju, keseimbangan komponen flavor dari produk dapat menentukan suatu produk disukai atau tidak. Banyak molekul flavor yang terdapat dalam produk fermentasi yang mempengaruhi hal tersebut. (Bosset dan Gauch, 1993; Urbach, 1995). Sebagai salah satu contoh, pada pematangan keju terdapat 3 jalur utama yang mengarah ke pembentukan flavor. Tiga jalur utama tersebut adalah konversi laktosa (glikolisis), lemak (lipolisis) dan kasein (proteolisis). Pada ketiga proses tersebut, kultur starter yang digunakan dalam fermentasi sebagai sumber utama enzim adalah golongan bakteri asam laktat seperti *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* (Bockelmann dan Seyler, 2001). Dalam kasus fermentasi laktosa, proses utama tentu saja merupakan konversi dari laktosa menjadi laktat oleh bakteri asam laktat. Fraksi piruvat yang merupakan produk intermediet dikonversi lebih lanjut menjadi diasetil, asetaldehida, acetoin ataupun asam asetat. Lipolisis berujung pada pembentukan asam lemak bebas yang menjadi prekursor metilketon, ester dan lakton. Konversi kasein dalam proteolisis juga memegang peranan penting dalam pembentukan flavor, terutama pada produk keju (Smit *et al.*, 2005). Berikut merupakan beberapa senyawa flavor yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat:

1. Diasetil

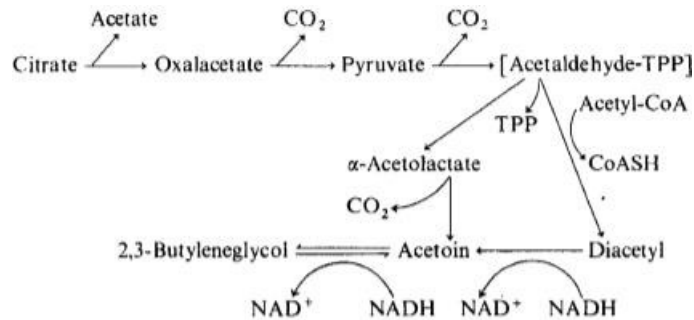
Diasetil biasanya diproduksi secara alami oleh bakteri asam laktat, terutama *L.lactis* biovar. *diacetylactis*. Diasetil diproduksi dari sitrat dalam fermentasi bersama dengan laktosa. Produk intermediet dari fermentasi, α -*acetolactate* merupakan prekursor dari diasetil. Diasetil dapat dibentuk dari α -*acetolactate* melalui reaksi dekarboksilasi oksidatif. Bakteri asam laktat yang menggunakan sitrat terdapat pada fermentasi susu untuk produksi mentega, mentega susu, dan beberapa jenis keju. Diasetil ini akan memberi aroma spesifik mentega pada produk-produk tersebut (Davidson *et al.*, 1995). Oberman *et al.* (1982) menyebutkan bahwa level diasetil yang mendekati 1 mg/kg dari mentega sudah cukup untuk mendapatkan aroma mirip mentega dari produk. Biasanya dalam produk susu, diasetil adalah senyawa flavor terpenting karena ambang batasnya yang rendah

Secara umum, berikut skema metabolisme untuk pembentukan senyawa flavor dari karbohidrat yang salah satunya merupakan diasetil.



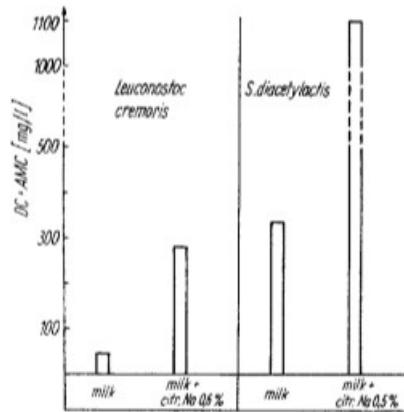
Gambar 1. Jalur Metabolisme Umum Pembentukan Senyawa Flavor dari Fermentasi Karbohidrat (Chen *et al.*, 2016)

Menurut Oberman (1982), skema produksi diasetil dari sitrat adalah seperti pada skema di bawah ini.



Gambar 2. Skema Produksi Diasetil dari Sitrat (Oberman, 1982)

Menurut eksperimen dari Oberman *et al.* (1982), dijelaskan bahwa susu merupakan media alami paling baik bagi bakteri asam laktat, dapat dihasilkan diasetil sebanyak 0,5-3,7 mg diasetil/l dan acetoin sebanyak 226-482 mg/l untuk bakteri *S.diacetylactis*. Pada bakteri *Leuconostoc cremoris* dihasilkan diasetil yang mirip, yaitu 0,3-3,5 mg/l dan acetoin yang lebih sedikit (sekitar 100mg/l). Sitrat memegang peranan penting dalam produksi senyawa aroma ini. Dalam medium lakotsa-pepton yang ditambahkan 1% natrium sitrat diperoleh bahwa produksi dari senyawa aroma ini meningkat hingga 3 kali lipat. Hal yang sama terlihat dalam medium susu, produksi senyawa aroma ini juga meningkat jauh setelah diberi tambahan sumber sitrat. Hal yang sama juga disampaikan oleh Hegazi dan Abo-Elnaga (1980), bahwa media susu skim dengan penambahan sumber sitrat dan piruvat akan dihasilkan lebih banyak senyawa flavor diasetil.



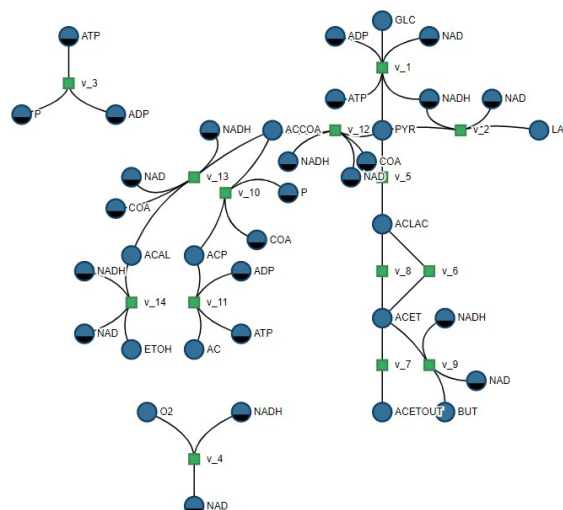
Gambar 3. Pengaruh Penambahan Sitrat pada Produksi Diasetil dan Acetoin (Oberman *et al.*, 1982)

Suhu merupakan parameter yang penting yang mempengaruhi kinetika biosintesis diasetil, terlihat bahwa jumlah diasetil yang dihasilkan meningkat hingga 30% ketika suhu dinaikkan dari 23°C ke 28°C, pada kedua suhu ini sebenarnya terlihat bahwa aktivitas enzim diasetil reduktase mengakibatkan pengurangan konsentrasi diasetil dengan proses yang lebih lambat pada suhu 28°C (Oberman, 1982). Oberman *et al.* (1982), menyimpulkan bahwa tidak mungkin untuk menyamakan kondisi optimal untuk produksi diasetil bagi semua bakteri asam laktat. Setiap strain, spesies dan subspecies harus dioptimasi secara independen. Strain, spesies dan subspecies bakteri asam laktat yang berbeda akan memiliki kemampuan yang berbeda dalam mengutilisasi sitrat ataupun piruvat menjadi diasetil (Hegazi dan Abo-Elnaga, 1980).

Karena nilainya yang tinggi sebagai senyawa pemberi aroma, efisiensi produksi diasetil dari laktosa daripada sitrat telah menjadi tujuan bagi beberapa strategi rekayasa metabolisme. Platteeuw *et al.* (1995) membangun sebuah strain yang kekurangan *ldh* (*lactate dehydrogenase*) yang dalam keadaan aerobik menunjukkan perubahan yang jelas pada metabolisme piruvat yang menyebabkan peningkatan produksi asetat dan acetoin. Dalam proses ini, α -*acetolactate* juga dihasilkan sebagai molekul intermediet yang tidak stabil. Dalam percobaan yang lain, inaktivasi *ldh* yang diikuti dengan ekspresi berlebihan gen *als* (α -*acetolactate synthase*) yang mengkode α -*acetolactate synthase* (ALS) menyebabkan produksi acetoin yang tinggi dan α -*acetolactate* yang cukup rendah (Hugenholtz, 1993). ALS adalah salah satu dari dua enzim yang mengkatalis konversi piruvat menjadi α -*acetolactate*, yang lainnya adalah asam aseto hidroksi sintase (ILVBN, yang dikode oleh gen *ilvBN*). ILVBN adalah enzim sintase anabolis yang berperan dalam sintesis rantai asam amino bercabang, sedangkan ALS berperan sebagai enzim sintase katabolis. Hugenholtz (1993) menyebutkan bahwa ekspresi berlebihan dari gen *ilvBN* dalam *L. lactis* yang ditumbuhkan dalam kondisi aerobik akan menyebabkan produksi ke arah acetoin sebanyak 4 kali lipat. Penelitian lain yang dilakukan Papagianni (2011) menyebutkan bahwa kloning yang dilakukan pada gen *als* pada *multi-copy plasmid* menyebabkan peningkatan konsentrasi ALS sebesar 100 kali lipat dan efisiensi untuk mengubah piruvat menjadi acetoin dalam kondisi aerobik hanya sebesar 40%. Percobaan-percobaan tersebut membuktikan bahwa usaha-usaha untuk menghasilkan diasetil secara efisien masih banyak menemui kegagalan. Benson *et al.* (1996) menyebutkan bahwa strain-strain tersebut masih memiliki gen *aldB* yang mengkode enzim α -*acetolactate*. Enzim tersebut berfungsi dalam mengubah α -*acetolactate* menjadi *acetoin*.

Pendekatan baru rekayasa metabolisme dilakukan pada *L.lactis* dengan mengontrol ekspresi NADH oksidase (NOX). Strain yang memproduksi NOX berlebihan diproduksi dengan menggunakan sistem *nisin inducible expression* (NICE) (Lopez de Felipe *et al.*, 1998). Produksi berlebihan NOX pada level aerasi yang dikontrol membuat kontrol NADH:NAD⁺ menjadi efektif, dan hal ini berujung pada perubahan keseluruhan dari pola fermentasi homolaktik menjadi *mixed acid*. Pengenalan system ini pada strain yang memiliki gen *aldB* yang diinaktivasi berujung pada konversi metabolisme piruvat ke arah α -*acetolactate* dan diasetil yang lebih efektif (de Ruyter *et al.*, 1996). Lebih lanjut, pada penelitian yang dilakukan Guo *et al.* (2012) melaporkan strategi baru untuk secara tepat mengontrol distribusi piruvat untuk mendapatkan setelan yang pas untuk produksi laktat dan diasetil di *L. lactis* melalui rekayasa promoter. Percobaan dilakukan dengan menggunakan promoter terpilih untuk ekspresi konstitutif dari gen NADH oksidase, aktivitas NOX pada strain liar meningkat menjadi 58,17 kali lipat dalam kondisi aerob. Melalui rasio NADH/NAD⁺ yang diubah, fluks piruvat ke laktat yang berkurang dialihkan ke diasetil dan hasil menunjukkan produksi meningkat dari $1,07 \pm 0,03$ mM menjadi $4,16 \pm 0,06$ mM.

Kemudian, Hoefnagel *et al.* (2002) mengadopsi strategi kombinasi yang lebih rasional yang terdiri dari model kinetik dari percabangan sekitar metabolisme piruvat di *L.lactis* yang lebih detail. Model tersebut menunjukkan enzim yang memiliki efek terbesar untuk fluks ke arah diasetil terdapat di luar cabang ALS, model tersebut sudah dikonfirmasi dengan eksperimen, sebagai contoh penghapusan pada *ldh* dan ekspresi berlebihan NOX meningkatkan fluks melalui cabang ALS dari 0% menjadi 75%.

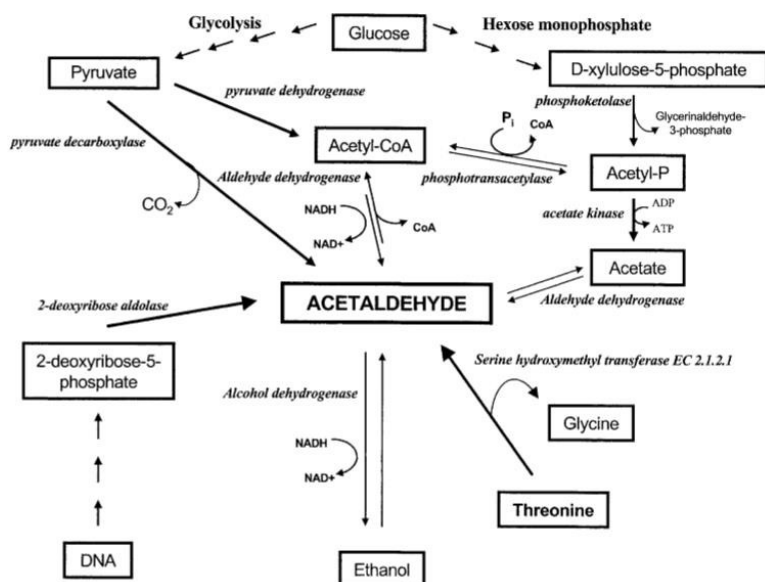


Gambar 4. Penampakan Model Kinetik Metabolisme Piruvat pada *L.lactis*

Lebih lanjut Oliveira *et al.* (2005) mendesain strain *L. lactis* yang dikembangkan untuk memproduksi diasetil melalui strategi rekayasa metabolisme yang ditingkatkan. Strategi-strategi ini melibatkan model fluks skala genom yang dapat mensimulasikan dan menganalisis kemampuan jaringan dan fungsi sel dalam kultur berkelanjutan yang dilakukan dalam kondisi aerob atau anaerob. Sebagai kerangka matematika untuk pemodelan digunakan analisis keseimbangan fluks (FBA) dan minimalisasi penyesuaian metabolik (MOMA).

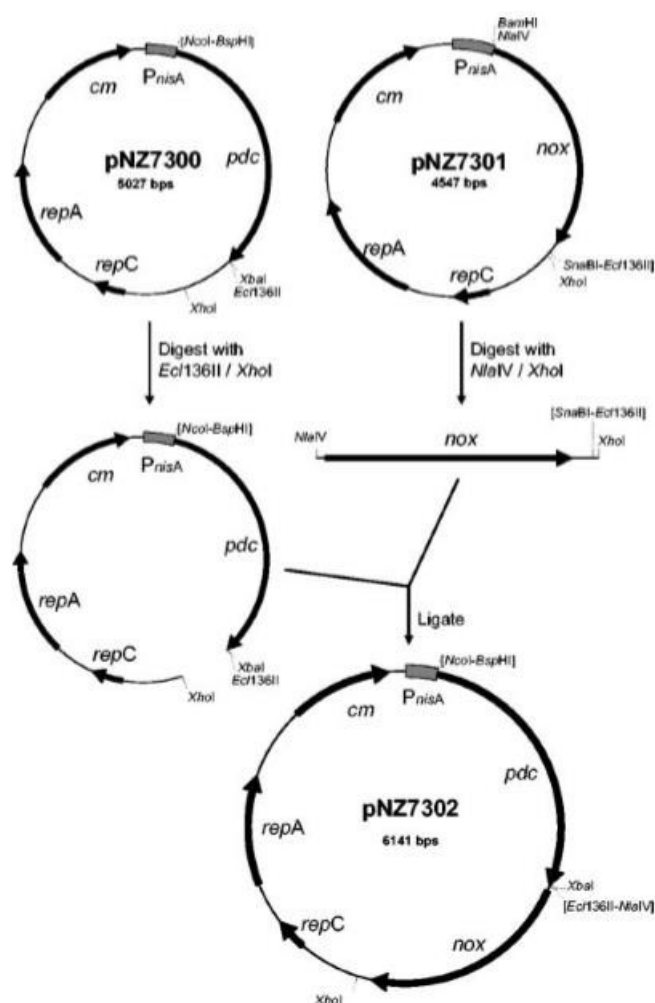
2. Asetaldehida

Sama seperti diasetil, asetaldehida juga merupakan senyawa aroma yang penting pada produk olahan susu seperti yoghurt. Asetaldehida banyak ditemukan di dalam yoghurt, yaitu sekitar 5-21 mg/l yang menunjukkan utilitas rendah dari senyawa ini karena bakteri dalam yoghurt tidak memiliki enzim *alcohol dehydrogenase* untuk mengonversi asetaldehida menjadi etanol (Lees dan Jago, 1976). Nampaknya produksi asetaldehida oleh bakteri asam laktat sangat tergantung pada strain yang digunakan. Percobaan yang dilakukan oleh beberapa peneliti pada strain *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* melaporkan bahwa strain ini memiliki kemampuan memproduksi asetaldehida yang lebih baik daripada strain *Streptococcus thermophilus*, di lain pihak beberapa peneliti melaporkan hasil yang kontradiktif (Ott *et al.*, 1997; Schirch *et al.*, 1985). Jalur utama bakteri asam laktat dalam memproduksi asetaldehida masih belum terlalu jelas. Yang jelas asetaldehida bisa diproduksi oleh bakteri asam laktat melalui beberapa jalur dan ada kemungkinan besar jalur-jalur tersebut beroperasi secara simultan (Gonzalez *et al.*, 1994; Raya *et al.*, 1986). Piruvat dan asetil-KoA yang merupakan intermediet dari proses glikolisis yang mengolah glukosa merupakan prekursor untuk sintesis asetaldehida oleh bakteri asam laktat (Lees dan Jago, 1976). Asam amino dan metabolit lain yang dikonversi menjadi piruvat juga dapat berkontribusi kepada biosintesis asetaldehida. Jalur paling penting adalah melalui konversi treonin menjadi asetaldehida dan glisin melalui reaksi yang dikatalisasi oleh treonin aldolase (Lees dan Jago, 1976; Chaves *et al.*, 2002).



Gambar 5. Skema Jalur Metabolisme yang Menghasilkan Asetaldehida oleh Bakteri Asam Laktat (Chaves *et al.*, 2002)

Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) yang dikode oleh gen *glyA* adalah enzim yang memiliki aktivitas enzim treonin aldolase pada bakteri *Streptococcus thermophilus*. Ekspresi berlebihan dari gen *glyA* pada strain *Streptococcus thermophilus* milik *Chaves et al.* (2002) akan berujung pada produksi berlebihan asetaldehida sebesar 80% hingga 90% apabila dibandingkan dengan strain asal. Upaya lain untuk meningkatkan produksi asetaldehida melalui rekayasa metabolisme dilaporkan oleh *Bongers et al.* (2005) terhadap strain *L.lactis*. Hasil menunjukkan bahwa ekspresi berlebihan dari *pyruvate decarboxylase* (*pdh*) dari *Zygomonas mobilis* dalam *L.lactis* memutar arah metabolisme piruvat menjadi asetaldehida. Ekspresi berlebihan gen yang dikontrol oleh sistem NICE berkompetisi dengan *lactate dehydrogenase* (*ldh*) untuk menggunakan piruvat yang ada. Untuk lebih meningkatkan availabilitas dari piruvat, gen NADH oksidase (*nox*) juga diekspresikan berlebihan. Rekayasa tersebut membuat pemanfaatan glukosa yang dikonsumsi menjadi asetaldehida hingga sebesar 50% dalam kondisi anaerobik.



Gambar 6. Skema Konstruksi Plasmid untuk Sistem NICE dari gen *pdh*, *nox* dan *pdh* dan *nox* (*Bongers et al.*, 2005)

DAFTAR PUSTAKA

- Benson, K.H., Godon, J.J., Renauld, P., Griffin, H.G., Gasson, M.G. (1996). Effect of *ilvBN*-encoded synthase expression on diacetyl production in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45:107-111
- Bockelmann, W. and Seyler, T.H. (2001). The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal*, 11:307-314
- Bosset, J.O. and Gauch, R. (1993). Comparison of the volatile flavour compounds of six European 'AOC' cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method *International Dairy Journal*, 3:359-377
- Bongers, R.S., Hoefnagel, M.H.N., and Kleerebezem, M. (2005). High-level acetaldehyde production in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:109-1113
- Chaves, A.C.S.D., Fernandez, M., Lerayer, A.L.S., Mierau, I., Kleerebezem, M., and Hugenholtz, J. (2002). Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:5656-5662
- Chen, C., Shanshan, Z., Guangfei, H., Haiyan, Y., Huaixiang, T. and Guozhong, Z. (2016). Role of lactic acid bacteria on the yoghurt flavour: a review. *International Journal of Food Properties*.
- Davidson, B.E., Llanos, R.M., Cancilla, M.R., Redman, N.C., Hillier, A.J. (1995). Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*
- de Ruyter, P.G.G.A., Kuipers, O.P., de Vos, W.M. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:3662-3667
- Gonzalez, S., Morata de Ambrosini, V., Manca de Nadra, M., Pesce de Ruiz, H.A., Oliver, G. (1994). Acetaldehyde production by strains used as probiotics in fermented milk. *Journal of Food Protection*, 57:436-440
- Guo, T., Kong, J., Zhang, L., Zhang, C., Hu, S. (2012). Fine tuning of the lactate and diacetyl production through promoter engineering in *Lactococcus lactis*. *PLoS ONE* 7:e36296
- Hegazi, F. and Abo-Elnaga, I.G. (1980). Production of acetoin and diacetyl by lactic acid bacteria in skimmed milk with added citrate and pyruvate. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 171:367-370
- Hugenholtz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*, 12:165-178
- Hoefnagel, M.H.N., Starrenburg, M.J.C., Martens, D.E., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., van Swam, Bongers, R., Westerhoff, H.V., Snoep, J.L. (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria, the combined approach: kinetic modelling, metabolic control and experimental analysis. *Microbiology*, 148:1003-1013
- Kandler O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonnie van Leuvenhoek*, 49: 209-224
- Kleerebezem, M., Hols, P., Hugenholtz, J. (2000). Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Enzyme Microbial Technology*, 26: 840-848.
- Lopez de Felipe, F., Kleerebezem, M., de Vos, W.M., Hugenholtz, J. (1998). Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. *Journal of Bacteriology*, 180:3804-3808.

- Lees, G.J., and Jago, G.R. (1976). Formation of acetaldehyde from threonine by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Research*, 43:75-83
- Oberman, H., Platkiewicz, A., Libudzisz, Z. (1982). Production of diacetyl and acetoin by lactic acid bacteria. *Die Nahrung*, 26:615-623
- Oliveira, A.P., Nielsen, J., Forster, J. (2005). Modeling *Lactococcus lactis* using a genome- scale flux model. *BMC Microbiology*, 5:39.
- Ott, A., Germond, J., Chaintreau, A. (2000). Determination and origin of the aroma impact compounds of yoghurt flavour. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45:850-858
- Papagianni M. (2011) *Lactococcus lactis* as a cell factory: A twofold increase in phosphofructokinase activity results in a proportional increase in specific rates of glucose uptake and lactate formation. *Enzyme and Microbial Technology*, 49:197-202.
- Platteeuw, C., Hugenholtz, J., Starrenbutg, M.J.C., van Alen-Boerrigter, I., de Vos, W.M. (1995) Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: influence of the overproduction of l8l-acetolactate synthase in strains deficient in lactate dehydrogenase as a function of culture conditions. *Applied and Environmental Technology*, 61:3967-3971.
- Raya, R.R., Manca de Nadra, M.C., Pesce de Ruiz. (1986). Threonine aldolase in *Lactobacillus bulgarius* ATCC 11842 and YOP12. *Milchwissenschaft*, 41:630-631.
- Schirch, V., S. Hopkins, E. Villar, and S. Angelaccio. (1985). Serine hydroxymethyltransferase from *Escherichia coli*: purification and properties. *Journal of Bacteriology*, 163:1-7
- Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:591- 610
- Urbach, G. (1995). Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal*, 5:877-903
- van Maris, A.J., Konings, W.N., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (2004). Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: implications for industrial processes. *Metabolic Engineering*, 6:245-255

TOPIK 7
Pembentukan Sweeteners (Pemanis) oleh Bakteri Asam Laktat
(Jocelyn Tanya - 17/410561/TP/11847)

1. L-alanin

L-alanin adalah pemanis makanan yang biasa digunakan pada industri farmasi. Produksi L- alanin dapat dilakukan dengan memanfaatkan *L. lactis* dengan memanfaatkan jalur sintesis lain pada bakteri sehingga bisa menghasilkan produk yang berbeda. Konversi asam piruvat menjadi alanin dapat dilakukan di berbagai bakteri anaerobik dan memanfaatkan satu reaksi enzimatik dengan alanin dehidrogenase. Jalur atau *pathway* untuk menghasilkan alanin dapat dilakukan oleh bakteri asam laktat dengan cara mengkloning ekspresi gen *alaD* dari *Bacillus sphaericus* yang mampu mengkodekan enzim L-alanin dehidrogenase (ALAD) dengan sifat kinetis yang mirip dengan laktat dehidrogenase (LDH) dari *L. lactis* (Platteeuw *et al.*, 1995). *alaD* dapat dikloning dengan promoter *nisA* yang terdapat pada *L. lactis*. Ekspresi gen ini akan menghasilkan 30-40% peningkatan efisiensi jalur dari laktat ke alanin saat glukosa diperlukan untuk mengubah piruvat menjadi alanin oleh ALAD. Selain itu, ketika sistem ini diintegrasikan ke sel *Lactococcus* yang mengalami defisiensi LDH, akan menghasilkan konversi sepenuhnya dari glukosa ke alanin (>99%), dengan mengubah metabolisme *L. lactis* dari homolaktis ke homoalanin (Platteeuw *et al.*, 1995). Konversi sepenuhnya dari glukosa ke L-alanin dengan *L. lactis* yang mengalami defisiensi LDH dapat dilakukan dengan inaktivasi gen alanin rasemase. Contoh ini menggambarkan bahwa metabolisme homofermentatif dari *L. lactis* dapat secara efisien dialihkan untuk menghasilkan produk lain yang bisa dikomersialisasi.

2. Manitol

Manitol, yang merupakan gula alkohol 6 karbon, dapat diproduksi secara komersial dengan proses hidrogenasi katalitik dari substrat campuran glukosa/fruktosa yang dapat dimanfaatkan pada industri pangan dan farmasi. Proses kimia yang dilakukan hanya dapat menghasilkan 25-30% manitol dari total gula yang digunakan dan produk utama yang dihasilkan dari proses tersebut yaitu sorbitol. Pemisahan manitol dan sorbitol merupakan proses yang relatif susah dan untuk pemisahan tersebut dibutuhkan biaya produksi yang tinggi dan didapatkan hasil yang rendah (Bonger *et al.*, 2005). Secara mikrobiologi, manitol dapat disintesis dari berbagai organisme eukaryotik (*fungi* dan *yeast*) dan beberapa bakteri, terutama bakteri asam laktat yang homofermentatif serta tidak menghasilkan sorbitol. Bakteri asam laktat yang homofermentatif juga dapat memproduksi manitol tetapi dalam jumlah yang sangat sedikit (Bonger *et al.*, 2005). Bakteri asam laktat ini dapat mengkonversi fruktosa menjadi manitol dengan enzim manitol dehidrogenase (MDH). Pada reaksi tersebut, sebagian fruktosa akan dialihkan ke jalur heterofermentatif dan sisanya akan menjadi akseptor elektron dan direduksi menjadi manitol (Saha *et al.*, 2011). Produksi manitol dapat ditingkatkan dalam reaksi ini jika fruktosa di-ko-fermentasikan dengan glukosa (Saha *et al.*, 2011). Peningkatkan produksi manitol juga dapat ditingkatkan dan dicapai dengan optimasi fermentasi manitol dengan bakteri asam laktat yang heterofermentatif.

Bakteri asam laktat heterofermentatif dapat memproduksi manitol dari fruktosa dengan kuantitas yang baik (hingga 66% dapat diproduksi). Akan tetapi, produksi manitol ini selalu diiringi dengan produksi asam laktat dan asam asetat serta metabolit lain dalam jumlah

yang sedikit. Dengan demikian, pengembangan strain bakteri asam laktat yang dapat memproduksi manitol secara berlebihan, atau yang sedikit memproduksi metabolit tambahan, bahkan yang tidak memproduksinya sama sekali, sehingga penelitian saat ini mengarah pada modifikasi metabolisme dari produksi manitol oleh bakteri asam laktat. Penelitian ini baru terbatas pada penelitian oleh Aarnikunnas *et al.* (2003) dan Helanto *et al.* (2005). Pada penelitian yang pertama dilakukan dengan inaktivasi gen *ldhD* dan gen *ldhL*. Strain *Lb. fermentum* digunakan dan dapat dihasilkan manitol dan L-laktat atau mannitol dengan asam piruvat pada sekali proses. Proses ini berlangsung secara anaerobik dan dihasilkan juga 2,3-butadienol sebagai metabolit tambahan. Pada penelitian kedua oleh Helando *et al.* (2005), mannitol yang dihasilkan dari fruktosa oleh *Leuconostoc pseudomesenteroides* meningkat dari 74% ke 84% dengan mengaplikasikan mutagenesis random ke organisme produser untuk menginaktivasi aktivitas fruktokinase.

Langkah lain juga dapat digunakan untuk meningkatkan produksi manitol dari bakteri asam laktat homofermentatif seperti *L. lactis* dan *Lb. plantarum*. Pada penelitian Neves *et al.* (2000) didapatkan bahwa sintesis manitol dan manitol-1-fosfat (Mtl1P) pada strain *L. lactis* yang mengalami defisiensi *ldh*. Produksi dari manitol dapat dijelaskan sebagai cara alternatif untuk menyeimbangkan neraca redox saat proses katabolisme dari glukosa karena konversi dari fruktosa-6-fosfat (F6P) menjadi Mtl1P sangat berkaitan dengan regenerasi NAD⁺. Diamati juga bahwa produksi manitol akan meningkat dengan cepat dan dapat dilakukan setelah deplesi dari glukosa sehingga sudah jelas bahwa strategi metabolisme untuk meningkatkan produksi manitol harus melibatkan inaktivasi dari sistem transpor manitol (*mannitol transport system*). Sistem transpor manitol dapat diinaktivasi dengan *L. lactis* yang defisiensi *ldh* dengan menghapus (*delete*) gene *mtIA* atau *mtIF* yang mengkode EII^{Mtl} dan EIIA^{Mtl} secara berurutan. Dalam keadaan istirahat, strain yang telah bermutasi tersebut dapat mengkonversi hampir 30% dari jumlah glukosa yang ada menjadi manitol. Konversi glukosa dari manitol tertinggi dilaporkan pada penelitian Wisselink *et al.* (2005) dengan mengkonversi glukosa sebanyak 50% ke manitol dengan *L. lactis* yang mengalami defisiensi *ldh*. Dengan strain tersebut, gen manitol-1-fosfat dehidrogenase dari *L. plantarum* dan gen mannitol-1-fosfat fosfatase dari protozoa *Eimeria tenella* (parasit) diekspresikan secara berlebih (*overexpressed*). Dari proses ini didapatkan 50% hasil dan sangat dekat dengan perkiraan teori produksi manitol oleh *L. lactis* sebesar 67%.

3. Sorbitol

Sorbitol, mirip manitol, merupakan gula alkohol yang terdiri atas 6 atom karbon dan aplikasi dari sorbitol ini sangat luas digunakan pada industri pangan dan farmasi. Sorbitol dapat diproduksi secara tradisional dengan hidrogenasi katalitik dari glukosa oleh beberapa organisme saja yang dapat melakukannya. Studi awal tentang produksi sorbitol dengan bioteknologi terfokus pada bakteri Gram *Zygomonas mobilis* yang dapat mengkonversi glukosa dan fruktosa menjadi sorbitol (Wisselink *et al.*, 2005).

Pada bakteri asam laktat, produksi sorbitol dengan modifikasi metabolisme dapat dilakukan oleh *Lb. plantarum* dan *Lb. casei*. Enzim manitol fosfat dehidrogenase (MPDH) dan LDH diinaktivasi pada strain *Lb. plantarum* yang mengalami ekspresi gen berlebih pada gen sorbitol dehidrogenase (*stIDH*). Karena kedua macam enzim tersebut MPDH dan LDH menggunakan fruktosa-6-fosfat (F6P) sebagai substrat, inaktivasi MPDH akan membuat lebih banyak F6P tereduksi menjadi sorbitol-6-fosfat oleh SDH. Hasilnya, pada sel yang istirahat dapat memanfaatkan glukosa sebagai substrat untuk menghasilkan produk yang hampir

sebanyak dengan hasil teoritisnya dari produksi sorbitol yaitu sebanyak 0,65 mol/mol glukosa (Ladero *et al.*, 2007). Nissen *et al.* (2005) mengkonstruksikan strain *Lb. casei* yang mengintegrasikan gen sorbitol-6-fosfat-dehidrogenase (*gutF*) pada operon kromosomal laktosa (*lac* operon). Gen ini dikontrol oleh *lac* operon yang dihambat oleh glukosa dan diinduksi oleh laktosa. Sel rekombinan yang masih muda saat kondisi istirahat yang ditumbuhkan pada laktosa dapat menghasilkan 0,024 mol sorbitol/mol glukosa. Pada strain yang sudah dewasa dapat menghasilkan jumlah yang tidak terkuantifikasi. Proses delesi gen *ldhL* dapat meningkatkan produksi sorbitol menjadi 0,043 mol sorbitol/mol glukosa karena peningkatan NADH di sel dapat meningkatkan laju konversi glukosa ke sorbitol.

4. Xylitol

Xylitol adalah gula gugus alkohol dengan 5 atom karbon yang saat ini diproduksi dengan reduksi kimia dari xylose (Akinteriwa *et al.*, 2008). Karena *yeast*, *fungi*, dan bakteri dapat mereduksi D-xyloza menjadi xylitol oleh xylitol reduktase, potensinya untuk produksi xylitol secara mikrobiologis mulai diteliti, terutama pada *yeast*, yang modifikasi metabolismenya sudah mulai diberdayakan. Bakteri asam laktat tidak dapat memproduksi xylitol secara alami meskipun strain *S. avium* dan *Lb. casei* dapat memetabolisme hal tersebut (London, 1990). Pada penelitian oleh Nyssölä *et al.* (2005), dilakukan konstruksi untuk strain *L. lactis* rekombinan dari gen *xylose reduktase* (XR) *Pichia stipitis* dan ko-ekspresi transporter *xylose* dari *Lb. brevis*. Akan tetapi, proses ini tidak meningkatkan produktivitas pembentukan xylitol.

DAFTAR PUSTAKA

- Aarnikunnas J., con Weymarn N., Ronnholm K., Leisola M., Palva A. 2003. Metabolic engineering of *Lactobacillus fermentum* for production of mannitol and pure L-lactic acid or pyruvate. *Biotechnol Bioeng* 82:653-663.
- Akinterinwa O., Khankal R., Cirino C. P. 2008. Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols. *Curr Opin Biotechnol* 19: 461-467.
- Bongers R.S., Hoefnagel MHN., Kleebezem M. 2005. High-level acetaldehyde production in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:879- 891.
- Helando M., Aarnikunnas J., von Weymarn N., Airaksinen U., Palva A., Leisola M: Improved mannitol production by a random mutant of *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *J Biotechnol* 2005, 116:283-294.
- Ladero V., Ramos A., Wiersma A., goffin P., Schanck A., Kreerebezem M., Hugenholtz J., Smid, E.J., Hols P. 2007. High-level production of the low-calorie sugar sorbitol by *Lactobacillus plantarum* through metabolic engineering. *Appl Environ Microbiol* 73:1864-1872.
- London J. 1990. Uncommon pathways of metabolism among lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 7: 103-111.
- Neves AR., Ramos A., Shearman CA., Gasson MJ., Almeida JS., Dantos H. 2000. Metabolic characterization of *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase using in vivo C-NMR. *Eur J Biochem* 267:3859-3868.
- Nissen L., Perez-Martinez G., Yebra M.J. 2005. Sorbitol synthesis by an engineered *Lactobacillus casei* strain overexpressing a sorbitol-6-phosphate dehydrogenase gene within the lactose operon. *FEMS Microbiol Lett* 249:177-183.

- Nyysola A., Pihlajaniemi A., Palva A., von Weymarn N., Leisola M. 2005. Production of xylitol from D-xylose by recombinant *Lactococcus lactis*. *J biotechnol* 118:55-66.
- Platteuw C., Hugenholtz K, Starrenburg MJC, van Alen-Boerrigter I, de Vos WM. 1995. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: influence of the overproduction of acetolactate synthase in strains deficient in lactate dehydrogenase as a function of culture conditions. *Appl Environ Microbiol* 61:3967-3971.
- Saha B.C., Racine F.M. 2011. Biotechnological production of mannitol and its application. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:879-891.
- Wisselink H., Moers AP., Mars AE., Hoefnagel MHN, de Vos WM, Hugenholtz J. 2005. Overproduction of heterologous mannitol-1-phosphatase: a key factor for engineering mannitol production by *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 71:1507-1514.

TOPIK 8
PRODUKSI EKSPOLISAKARIDA (EPS)
(Christophorus R Obed Hae - 17/414016/TP/11958)

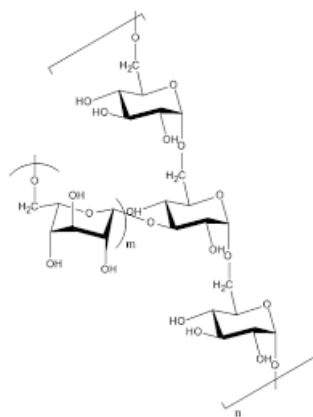
Eksopolisakarida (EPS)

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan jenis bakteri yang dapat menghasilkan asam laktat dari proses metabolisme yang dilakukan untuk mendapatkan energi. Namun, beberapa bakteri asam laktat juga menghasilkan produk metabolit lain yang juga dapat dimanfaatkan oleh manusia dalam industri pangan. Salah satunya adalah eksopolisakarida (EPS). Eksopolisakarida merupakan polimer yang terdiri dari monosakarida dan beberapa substituen seperti suksinat, piruvat, asetat, dan fosfat serta komponen - komponen biomolekul yang disekresikan oleh mikroorganisme dan memiliki beragam karakteristik yang spesifik terhadap jenis bakteri serta kondisi lingkungan (Vu *et al.*, 2009). Jenis bakteri asam laktat yang memproduksi EPS antara lain *Lactococcus* dan *Streptococcus*. Sintesis EPS secara *in situ* dapat meningkatkan karakter produk pangan dari aspek reologi serta sensori meliputi *mouthfeel* dan tekstur produk sehingga dalam industri pangan sering digunakan sebagai pengental, pengemulsi, dan *gelling agent*. Selain itu, EPS juga dapat meningkatkan fungsi kesehatan produk pangan akibat perannya sebagai prebiotik serta kemampuan bioaktivasi yang baik sehingga memiliki aktivitas anti inflamasi dan anti virus (Llamas *et al*, 2010).

Berikut adalah penjelasan beberapa jenis EPS produksi pabrik untuk menunjukkan perbedaan antar satu sama lain yang mempengaruhi sifat dan karakteristik yang dimiliki beserta pemanfaatannya.

1. Dekstran

Dekstran merupakan polimer kompleks dari glukosa yang memiliki cabang dengan membentuk ikatan α -1,6 dan α -1,3 glikosidik. Dekstran hasil metabolisme bakteri asam laktat memiliki berat molekul yang besar sekitar 10-150 kDa. Dekstran memiliki manfaat kesehatan yang beragam seperti anti inflamasi, anti trombotik, anti koagulan, hingga memiliki peran yang penting sebagai intraarterial dan intravenous (Veronese and Caliceti, 2006).

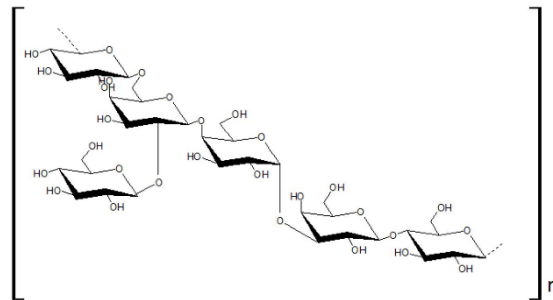


(Lapasin, 1999).

2. Kefiran

Kefiran adalah polisakarida berbentuk kapsul metabolit strain *Lactobacillus* pada fermentasi susu dalam pembuatan kefir. Struktur polimernya tersusun atas monomer D-glukosa atau heteropolisakarida D-galaktosa yang bercabang pada 2 unit rantai serta 8 unit

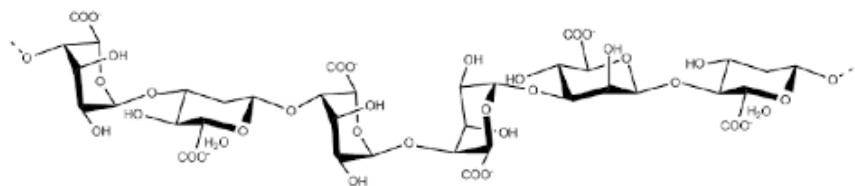
rantai. Aktivitas anti bakteri, anti jamur, dan anti kanker adalah kemampuan meningkatkan kesehatan yang dimiliki kefir (Vu *et al.*, 2009)



(Micheli *et al.*, 1999)

3. Gellan

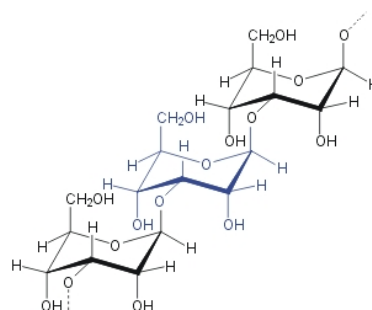
Gellan adalah polimer linier bermuatan negatif yang terdiri dari tetrasakarida berulang sebagai kombinasi antara dua molekul glukosa dengan asam D-glukoronat atau L-ramnosa. Gellan dapat dimanfaatkan sebagai substitusi agar ataupun eksipien obat dalam drug delivery system (Vu *et al.*, 2009; Fialho *et al.*, 2008).



(Lapasin, 1999)

4. Curdlan

Curdlan merupakan polimer linier yang tersusun dari ikatan β-1,3 glikosidik dari D-glukosa dengan kelarutan dalam air yang tinggi. ekpolisakarida jenis ini merupakan metabolit strain *Alcaligenes faecalis*. Elastisitas gel pada suhu di atas 55°C membuat *curdlan* dimanfaatkan memperbaiki tekstur makanan dan sebagai eksipien drug delivery (Rehm, 2009; Gummadi *et al.*, 2005)

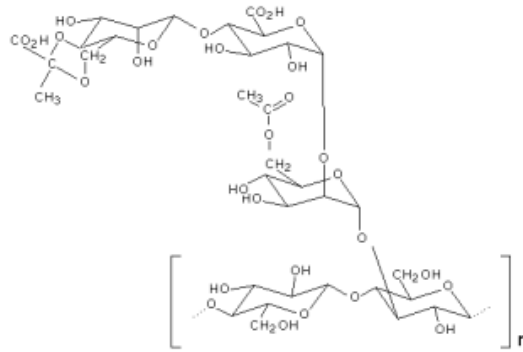


(Jin *et al.*, 2006)

5. Xanthan

Xanthan adalah heteropolimer anionik yang terdiri dari gula glukosa dengan rantai samping trisakarida dari α-D-manosa yang memiliki gugus asetil. Xanthan merupakan metabolit strain *Xanthomonas* dengan berat molekul yang sangat besar (Rehm, 2009). Xanthan memiliki sifat pseudoplastik dan dapat digunakan sebagai emulsifier yang stabil, sehingga sering dimanfaatkan dalam industri makanan, kosmetik, maupun farmasi (Sutherland, 1998).

(Sutherland,



2001)

Upaya Peningkatan Produksi EPS dengan Rekayasa Metabolisme

Dalam perkembangannya, produksi EPS secara alami oleh bakteri asam laktat memiliki nilai *yield* yang rendah dibandingkan EPS yang diproduksi oleh industri seperti xanthan, curdian, gellan, dan dekstran menggunakan *non-dairy bacteria*. Hal ini mendorong dilakukannya upaya rekayasa metabolisme dalam meningkatkan produksi EPS dengan bakteri asam laktat. Strategi dan upaya rekayasa metabolisme yang telah dilakukan memiliki fokus pada sintesis prekursor. Nukleotida gula seperti UDP-glukosa, UDP-galaktosa dan TDPramnosa disintesis dari glukosa-1-fosfat sebagai prekursor utama produksi EPS. Glukosa-1-fosfat (G1P) diperoleh dari konversi G6P menggunakan enzim fosfoglukomutase (PGM). Sintesis prekursor UDP-glukosa dibantu oleh enzim UDP-glukosa fosforilase (Ga1U) sebagai katalisator. Proses konversi G6P menjadi G1P dan sintesis prekursor UDP-glukosa merupakan titik kontrol dalam produksi EPS sehingga menjadi objek utama dalam upaya rekayasa metabolisme (Papagianni, 2012).

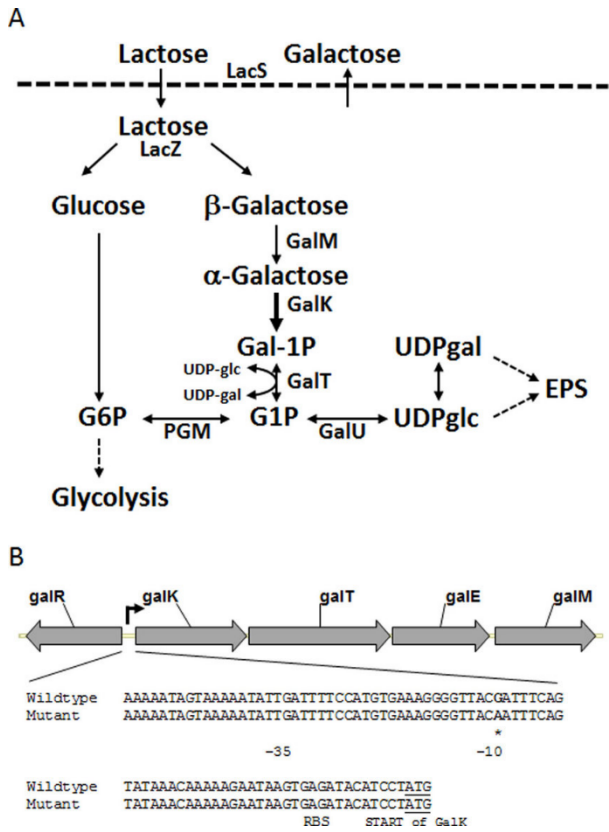
Overekspresi UDP-glukosa fosforilase (Ga1U) menggunakan promoter yang dapat terinduksi oleh nisin telah ditemukan dapat meningkatkan aktivitas spesifik enzim bersangkutan senilai 20-kali pada *Lactococcus lactis*. Peningkatan aktivitas enzim ini juga diikuti dengan peningkatan sintesis prekursor UDP-glukosa dan UDP-galaktosa sebanyak 8-kali walaupun tidak diikuti dengan peningkatan produksi EPS secara signifikan. Akan tetapi, overekspresi pada enzim fosfoglukomutase (PGM) dan UDP-glukosa fosforilase (Ga1U) pada *Streptococcus thermophilus* ditemukan dapat meningkatkan sintesis EPS sebanyak 2-kali. Selain rekayasa metabolisme, dapat digunakan pendekatan lain dengan melakukan rekayasa struktur pada produksi bakteri asam laktat. Hal ini dapat dicapai dengan melakukan kontrol pada kondisi kultur meliputi suhu, jenis gula sebagai substrat, dan lain – lain ataupun dengan rekayasa genetika. Potensi pengontrolan proses pembentukan struktur EPS dengan menambahkan enzim glikosiltransferase pada bakteri asam laktat sudah ditemukan (Papagianni, 2012).

Dalam penelitiannya, Johansen *et al* (2012) melakukan upaya dalam meningkatkan produksi EPS dengan melakukan manipulasi genetika strain *Streptococcus thermophilus* yang tidak dapat tumbuh menggunakan sumber karbon gula dalam bentuk galaktosa akibat adanya gen lengkap yang mengkode enzim yang dibutuhkan. Manipulasi yang dilakukan meningkatkan aktivitas enzim fosfoglukomutase dan glukosa-1-fosfat uridiltransferase dalam jalur metabolisme galaktosa sehingga diikuti dengan peningkatan produksi. Peningkatan aktivitas enzim galaktokinase dengan rekayasa genetika pada strain *S. thermophilus* juga dapat meningkatkan produksi EPS. Akan tetapi, pemanfaatan strain hasil rekayasa genetika tersebut dengan *Lactobacillus bulgaricus* dalam pembuatan yoghurt tidak menstimulasi peningkatan produksi EPS secara signifikan sehingga karakteristik tekstur yang diinginkan

tidak tercapai. Belum dilaporkan adanya perbaikan parameter reologi pada yoghurt dengan modifikasi aktivitas enzim dalam jalur metabolisme galaktosa tanpa menggunakan teknik rekombinasi DNA (Derkx *et al*, 2014).

Dalam industri produk pangan dengan bahan dasar susu, *S. thermophilus* CHCC6008 sering digunakan karena kemampuannya dalam memberikan tekstur spesifik pada susu fermentasi. Kemudian, dalam perkembangannya dilakukan isolasi strain CHCC11379 sebagai hasil mutasi CHCC6008 yang positif galaktosa berdasarkan seleksi dominasi. Kemampuan memberikan tekstur pada strain CHCC11379 mengalami peningkatan sebesar 10% dibandingkan dengan strain induk CHCC6008 diukur menggunakan *shear stress*. Analisis operon galaktosa CHCC11379 menunjukkan bahwa terjadi mutasi basa nitrogen G menjadi A di posisi -10 pada promoter ga1K sehingga diperoleh *Pribnow box* "TATAAT". *Pribnow box* yang sudah teroptimasi ini meningkatkan transkripsi gen dari operon galaktosa (ga1K, ga1T, ga1E dan ga1M) sebanyak 2.5 hingga 3.7 fold. Akan tetapi, jumlah EPS yang diproduksi dalam fermentasi susu tidak mengalami peningkatan yang signifikan pada penggunaan strain CHCC11379 sehingga dapat disimpulkan bahwa kemampuan memfermentasi galaktosa merubah kultur bersama dengan strain *Lactobacillus bulgaricus* positif EPS. Hal ini menunjukkan bahwa tekstur pada susu tidak dipengaruhi oleh jumlah EPS yang dihasilkan saja melainkan juga oleh struktur EPS serta interaksi antara jenis EPS yang berbeda yang berperan dalam menyusun komposisi EPS yang diproduksi dalam suatu produk pangan. Hal ini bertentangan dengan hasil penelitian Robitaille *et al* yang menemukan bahwa penggunaan strain CHCC11379 dapat meningkatkan viskositas serta *shear stress* pada pembuatan yoghurt (Derkx *et al.*, 2014).

Berikut merupakan skema dari produksi EPS melalui jalur metabolisme galaktosa dan laktosa pada *S. thermophilus* dimana laktosa akan diubah menjadi glukosa dan β -galaktosa.



(Derkx, 2014)

Glukosa akan diubah menjadi G6P. Sebagian G6P akan masuk dalam proses glikolisis dan sebagian lainnya akan dikonversi menjadi G1P oleh fosfoglukomutase. β -galaktosa akan diubah menjadi G1P oleh transkripsi genetic operon galaktosa seperti Ga1M menjadi α -galaktosa. Kemudian, oleh Ga1K akan diubah menjadi Gal-1P. Selanjutnya, akan di ubah menjadi G1P oleh Ga1T. Bersama dengan G1P hasil konversi G6P, seluruh akumulasi G1P akan diubah oleh Ga1U menjadi precursor yaitu UDP-glukosa dan UDP-galaktosa yang akan menstimulasi produksi EPS pada strain *S. thermophilus* yang digunakan. Sedangkan pada strain CHCC11379 dilakukan mutasi genetic pada operon galaktosa dan terjadi optimasi *Pribnow box* yang berakibat pada peningkatan traskripsi genetic operon galaktosa (overekspresi ga1K ditandai dengan panah tebal) dan meningkatkan jumlah produksi EPS yang terjadi seperti uraian sebelumnya (Derkx, *et al.*, 2014).

DAFTAR PUSTAKA

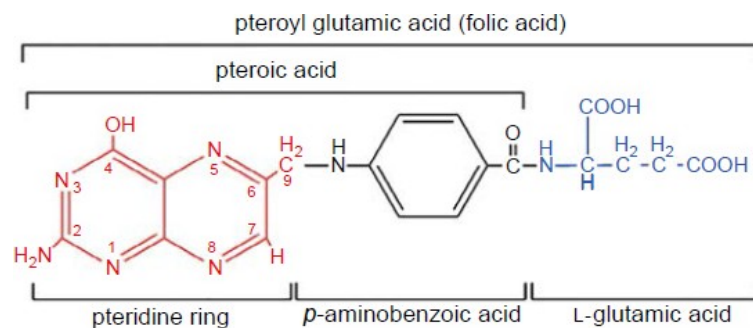
- Derkx, Patrick MF., Thomas Janzen, Kim I Sørensen, Jeffrey E Christensen, Birgitte Stuer-Lauridsen, Eric Johansen. 2014. *The art of strain improvement of industrial lactic acid bacteria without the use of recombinant DNA technology*. 11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria. Netherlands
- Fialho, Arsenio M., Moreira, Leonilde Morais., Granja, Ana Teresa., Popescu, Alma O. 2008. *Occurrence, production, and applications of gellan: Current state and perspectives*. Lisbon : Applied Microbiology and Biotechnology
- Gummadi, Sathyanarayana & Kumar, D. Sunil. 2005. *Microbial Pectic Transeliminases*. Madras : Biotechnology Letters.
- Jin Y, Zhang H, Yin Y, Nishinari K. 2006. *Comparison of curdlan and its carboxymethylated derivative by means of Rheology, DSC, and AFM*. NCBI
- Lapasin, Romano. 1999. *The polysaccharides sources and structures*. Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications
- Llamas, Bastien., Valverde, Guido., Fehren-Smithz, Lars, Weyrich, Laura S., Cooper, Alan., Haak, Wolfgang. 2016. *From the field to the laboratory: Controlling DNA contamination in human ancient DNA research in the high-throughput sequencing era*. STAR: Science and Technology of Archaeological Research.
- Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C., Crescenzi, V. 1999. *Isolation and characterisation of a ropy Lactobacillus strain producing the exopolysaccharide kefiran*. US National Library of Medicine National Institutes of Health. NCBI
- Papagianni, Maria. 2012. *Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds*. Computational and Structural Biotechnology Journal.
- Rehm, Bernd H. A. 2009. *Alginates Production : Precursor Biosynthesis, Polymerization, and Secretion*. Alginates : Biology and Application.
- Sutherland, I. W. 1998. *Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides*. US National Library of Medicine National Institutes of Health. NCBI
- Veronese, F. M. & Caliceti, P. 2006. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Biotech Drugs : Principles and Case Studies in Drug Development*. Meibohm
- Vu, Barbara., Chen, Miao., Crawford, Russell J., Ivanova, Elena P. 2009. *Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation*. MDPI Journal

TOPIK 9
PRODUKSI ASAM FOLAT OLEH BAKTERI ASAM LAKTAT
(Gerarda Tania Yudhanti – 17/410557/TP/11843)

Asam Folat

Asam folat (seperti terlihat pada Gambar 9.1) merupakan mikronutrien esensial yang berfungsi pada metabolisme seluruh makhluk hidup. Asam folat termasuk dalam kelompok Vitamin-B yang larut air, vitamin-B merupakan kelompok vitamin yang terkandung dalam berbagai jenis sumber pangan (LeBlanc *et al*, 2018), namun vitamin juga sangat mudah hilang dan rusak saat pemasakan dan proses pengolahannya, hal ini merupakan alasan mengapa masih banyak orang yang mengalami defisiensi vitamin B seperti asam folat ini di berbagai negara.

Manusia tidak dapat hidup tanpa intake folat, hal ini karena vitamin ini merupakan co-factor penting pada aktivitas metabolic dari setiap sel makhluk hidup, seperti biosintesis asam amino dan asam nukleat. Asam Folat dapat diproduksi oleh beberapa bakteri asam laktat dan bakteri asam propional dalam jumlah yang besar dan memperkaya makanan fermentasi (Papagianni,2012).



Gambar 9.1. Struktur Kimia Asam Folat Sumber : LeBlanc *et al*, 2018

Bakteri Asam Laktat dalam Produksi Asam Folat

Beberapa strain bakteri asam laktat (BAL) mampu memproduksi, mengeluarkan dan meningkatkan senyawa spesifik seperti vitamin. Banyak penelitian yang menunjukkan bahwa bakteri asam laktat (BAL) industrial seperti *Lactococcus lactic* dan *Streptococcus thermophilus* memiliki kemampuan untuk mensintesis folat. Hal ini dapat menjelaskan mengapa produk fermentasi susu seperti yogurt dapat mengandung jumlah folat lebih tinggi daripada produk dari susu yang tidak difermentasi. Namun, kemampuan kultur bakteri untuk memproduksi folat sangat bervariasi dan strain spesifik, atau tergantung dari masing-masing strain. Pada awalnya diyakini bahwa *St. thermophilus* dapat memproduksi folat saat *Lactobacillus (L.) delbrueckii* subsp. *bulgaricus* menggunakan folat untuk pertumbuhannya, merupakan contoh dari simbiosis antara spesies tersebut, dalam fermentasi yogurt. Namun, kemudian diketahui bahwa beberapa strain *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, yang diisolasi dari produk fermentasi susu dari Argentina, dapat tumbuh pada kultur medium yang tidak mengandung folat dan mampu memproduksi folat dengan konsentrasi yang tinggi (LeBlanc *et al*, 2018). Pada tabel 9.1 disajikan bakteri asam laktat yang dapat menghasilkan folat.

Tabel 9.1 Bakteri Asam Laktat yang dapat menghasilkan Folat

NO	Spesies- Strain	Produk Pangan	Keterangan
1	<i>S. thermophilus</i> (CRL 803 dan CRL 415) dan <i>L. bulgaricus</i> CRL 871	Yogurt	Dapat meningkatkan konsentrasi folat dalam yogurt lebih besar dari yogurt konvensional.
2	<i>L. amylovorus</i> CRL 887	Yogurt	Kultur ditambahkan pada pembuatan yogurt, dapat meningkatkan konsentrasi folat (260µg/L)
3	<i>L. rhamnosus</i> LGG dan <i>S. thermophilus</i> TH-4	Susu Kedelai Fermentasi	Digunakan sebagai kultur, dapat meningkatkan folat.
4	<i>Lactococcus lactis</i> N8 dan <i>Saccharomyces boulardii</i> SAA655	Idli Batter	Dapat meningkatkan level folat dan riboflavin sampai 40-90%
5.	Beberapa strain <i>Weissella</i>	Ikan fermentasi (Thailand)	Dapat memproduksi folat pada medium yang tidak mengandung folat dengan konsentrasi maksimum 4,14µg/L

(LeBlanc *et al*, 2018)

Dengan beberapa temuan ini, seleksi yang benar untuk strain yang dapat memproduksi folat dan optimalisasi kondisi fermentasi menjadi syarat yang penting untuk meningkatkan produksi folat dalam produk. Contohnya adalah untuk produksi folat oleh *S thermophiles* CRL 803 akan optimal dan menghasilkan konsentrasi folat yang tinggi saat strain ditumbuhkan pada suhu 42°C dibawah kontrol dengan fermentasi pada pH 6.0. Contoh lainnya adalah, menurut penelitian kombinasi *St thermophilus/bifidobacterium/Enterococcus (E.) faecium* dapat meningkatkan folat, dan kombinasi dari *St. thermophilus* dan *B. animalis* juga dapat meningkatkan folat. Contoh lainnya adalah penggunaan BAL untuk meningkatkan level folat pada produk fermentasi adalah pada fermentasi tepung jagung, dimana peningkatan folat dapat mencapai tiga kali lipat setelah fermentasi selama 4 hari pada suhu 30°C.

Aplikasi dari bio-fortifikasi dari produk harian menggunakan mikroorganisme penghasil vitamin merupakan alternatif yang menarik untuk penggunaan asam folat sintetik dalam makanan fermentasi. Seleksi yang ketat dari strain yang memproduksi folat dan optimasi dari produksi oleh strain-strain ini merupakan hal yang penting dan dapat meningkatkan pengayaan secara natural folat dalam berbagai macam produk.

Produksi Asam Folate menggunakan Modifikasi Genetika Bakteri Asam Laktat

Gen biosintesis folat sudah diidentifikasi dalam *Lc. lactis*, *L. plantarum* dan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Informasi baru membuka kesempatan untuk penelitian dan memungkinkan untuk perkembangan dari teknik *metabolic engineering* yang tidak hanya penting untuk memahami *pathway* metabolisme yang kompleks namun juga memungkinkan untuk memodifikasi genetik dari bakteri asam laktat untuk memproduksi komponen biologis. Saat ini *Lc. lactis* merupakan bakteri asam laktat yang paling sering diteliti dan sudah beberapa dekade ini jumlah dari alat genetika telah dikembangkan untuk starter bakteri ini. Alat- alat tersebut merupakan hal yang penting dalam strategi *metabolic engineering* yang memiliki

tujuan pada inaktivasi dari gen yang tidak diinginkan atau gen yang overekspresi. Pada hal ini, sistem *nisin-controlled expression* (NICE) untuk mengontrol heterogenus dan homogenus ekspresi gen pada *Lc. lactis* secara khusus telah terbukti sangat penting.

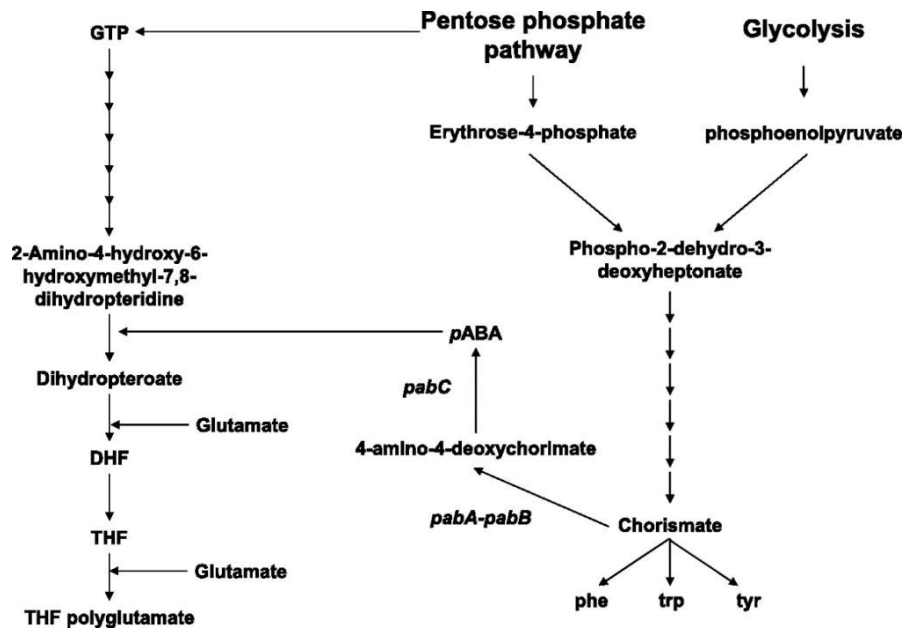
Rancangan dari pendekatan yang rasional untuk *metabolic engineering* membutuhkan pemahaman yang tepat tentang *pathway* yang dimanipulasi dan gen yang terlibat, lebih baik dengan kombinasi ilmu tentang faktor yang mengontrol. *Metabolic engineering* dari *pathways* yang lebih kompleks terlibat dalam metabolisme sekunder yang dimulai dengan teknik produksi exopolisakarida pada *Lc. lactis* dan dilanjutkan dengan *pathway* kompleks lainnya seperti biosintesis folat. Biosintesis ini melibatkan bagian dari glikolisis, *pathway* pentose fosfat, dan *shikimate pathway* untuk produksi *building block* dari folat yaitu pABA, saat biosintesis purin dibutuhkan untuk produksi *building block* GTP. Selain itu, banyak enzim spesifik yang dibutuhkan atau dilibatkan dalam penyusunan final folat dan untuk produksi berbagai macam derivat folat.

Telah diketahui bahwa beberapa bakteri asam laktat tidak dapat mensintesis folat karena beberapa gen yang terlibat pada biosintesis folat tidak tersedia pada genome bakteri ini, kasus ini untuk *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. acidophilus*, dan *L. johnsonii*. Sudah dibuktikan bahwa *metabolic engineering* dapat digunakan untuk meningkatkan levels folat pada *Lc. lactis*, *L. gasseri* dan *L. reuteri*. Pada sel, folat tersedia sebagian besar dalam bentuk poliglutamil, dengan fakta bahwa beberapa *folate-dependent enzyme* meningkatkan afinitas untuk poliglutamil folat daripada monoglutamil. Enzim ini bertanggung jawab untuk sintesis poliglutamil folat dan penyesuaian elongasi pada rantai adalah poliglutamil sintetase (EC 6.3.2.17) yang dikode oleh gen *folC* pada *Lc. lactis*. Sampai sekarang semua sekuens gen mikrobia memiliki *folC* atau satu gen yang mirip.

Biosintesis folat pada *Lactococcus lactis*

Biosintesis folat (Gambar 9.2) pada *Lactococcus lactis* berlangsung melalui konversi GTP (guanosin tripospat) dengan 7 tahap menjadi tetrahidrofolat (THF). Dua reaksi kondensasi berperan dalam jalur biosintesis THF. Reaksi kondensasi pertama adalah antara asam paraaminobenzoat dengan 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7, 8-dihydropteridine untuk menghasilkan dihydropteroate. Reaksi kondensasi kedua antara glutamat dengan dihydropteroate membentuk dihydrofolate. pABA (paraaminobenzoic acid) disintesa dari jalur pentosa fosfat; pada jalur ini D-erythrose 4-phosphate terkondensasi dengan phosphoenolpyruvate membentuk *chorismate*. Dari *chorismate* terbentuk asam amino aromatik (phenil alanin, triptopan dan tyrosin) dan pABA (Wegkamp *et al.*, 2007).

Molekul folat terdiri dari satu cincin pteridin yang berasal dari 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate (DHPPP) yang berikatan dengan asam para-aminobenzoat (pABA). Jalur *de novo* biosintesis folat oleh bakteri probiotik, terlihat pada Gambar 9.3., memerlukan dua prekursor, DHPPP dan pABA. DHPPP dan pABA bisa diproduksi oleh tanaman dan bakteri dari jalur pentosa fosfat (Rossi *et al.*, 2011). Erythrose 4-phosphate dan phosphoenolpyruvate melalui jalur shikimate akhirnya terbentuk *chorismate*, yang merupakan cabang menuju biosintesis asam amino aromatik dan pABA. *Chorismate* diubah oleh enzim aminodeoxychorismate synthase (EC 2.6.1.85) menjadi 4-amino-4-deoxychorismate. Kemudian, pyruvate dipecah oleh 4-amino-4-deoxychorismate lyase (EC 4.1.3.38) untuk membentuk pABA, yang merupakan prekursor terjadinya biosintesa folat. Biosintesa DHPPP terjadi melalui perubahan guanosin trifosfat (GTP) dengan 4 (empat) tahap yang berurutan.

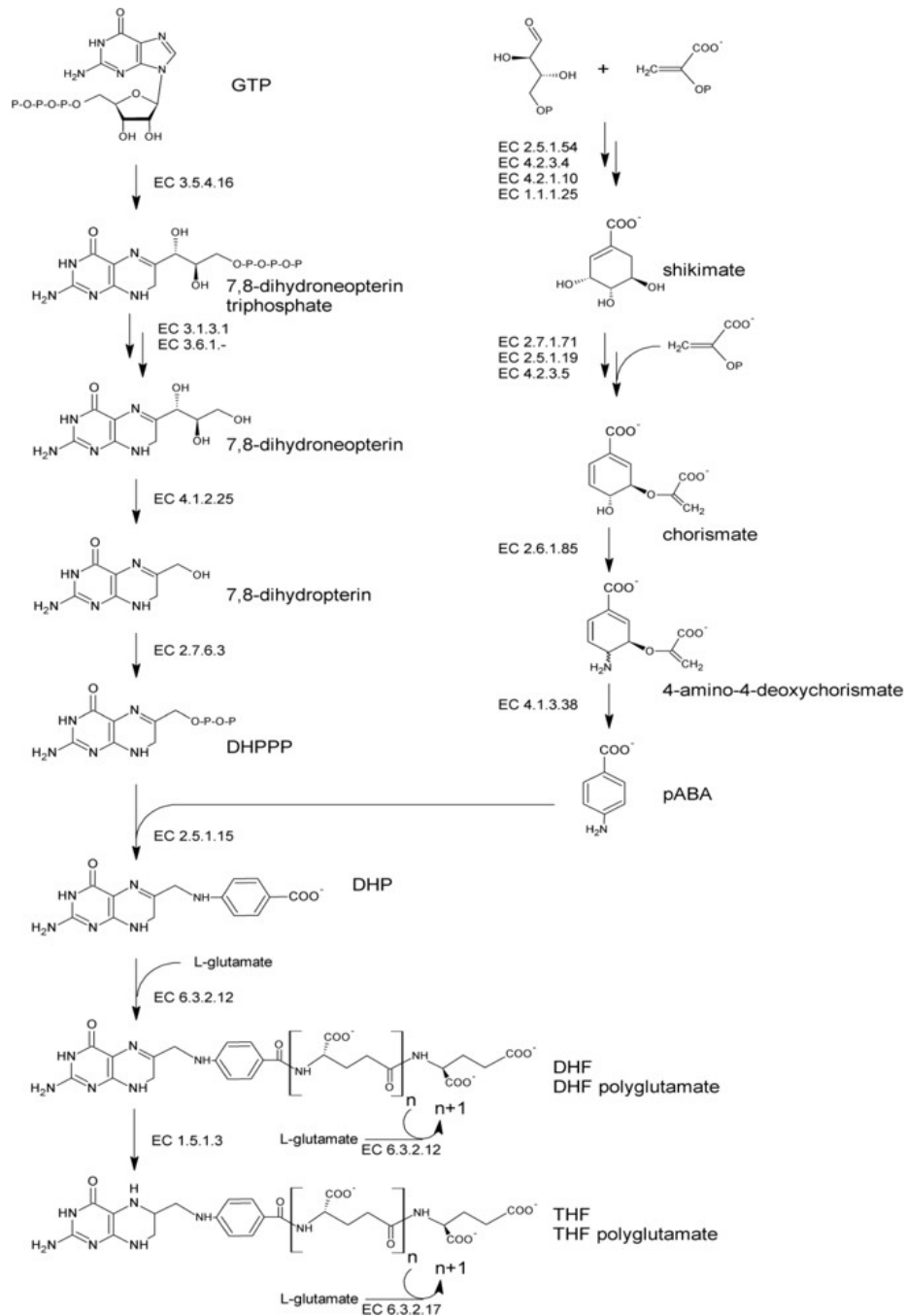


Gambar 9.2 Jalur biosintesis pABA dan folat pada *L.lactis* , menunjukkan konversi GTP menjadi THF, jalur biosintesis pABA dari chorismate dan perubahan pABA menjadi THF.
 Sumber : Wegkamp et al., 2007

Tahap yang pertama dikatalisa oleh GTP cyclohydrolase I (EC 3.5.4.16) dan melibatkan perubahan GTP melalui *Amadori rearrangement* (pengaturan Amadori), untuk membentuk struktur cincin pterin. Diikuti defosforilasi, molekul pterin berubah menjadi aldolase dan reaksi pyrophosphokinase, yang mengaktifkan pyrophosphorylated DHPPP synthase (EC 2.5.1.15) menghasilkan 7,8-dihydropteroate (DHP). Oleh dihydrofolate synthase (EC 6.3.2.12) DHP diubah menjadi dihydrofolat (DHF). Kemudian direduksi oleh DHF reduktase (EC 1.5.1.3) menjadi kofaktor tetrahydrofolat (THF) dan dengan penambahan glutamat dalam jumlah banyak oleh foylpolylglutamate synthase (EC 6.3.2.17) untuk menghasilkan THF-polyglutamate. Biosintesa folat berlanjut dengan terbentuknya ikatan C-N yang terbentuk dari bergabungnya DHPPP dengan pABA. Reaksi kondensasi ini dikatalisa oleh dihydropteorat.

DAFTAR PUSTAKA

- LeBlanc, J.G., de Giori, G.S., Smid, E.J., Hugenholtz, J. and Sesma, F., 2018. Folate Production by Lactic Acid Bacteria pp 15-29
- Papagianni, M., 2012. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production industrially important compounds. *Computational and structural biotechnology journal*, 3(4), p.e201210003.
- Rossi, M., Amaretti, A., dan Raimondi, S. (2011). Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* 3:118-134.
- Wegkamp, A., Oorschot, W. V., De Vos, W. M., and Smid, E. J. (2007). Characterization Of The Role Of Para-Aminobenzoic Acid Biosynthesis In Folate Production By *Lactococcus Lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 73(8): 2673– 2681.



Gambar 9.3 Jalur *de novo* biosintesis folat oleh bakteri probiotik Sumber : Rossi *et al.*, 2011

TOPIK 10
STRAIN IMPROVEMENT PADA BAKTERI ASAM LAKTAT
TANPA PENGGUNAAN TEKNOLOGI REKOMBINASI DNA
(Sitaresmi - 17/415289/TP/12025)

Upaya pengembangan produk baru pada industri pengolahan pangan ialah suatu hal yang tidak henti dilakukan sampai saat ini, tak terkecuali pada industri pengolahan pangan yang berbasis fermentasi menggunakan mikrobia. Pengembangan produk baru ini dilakukan untuk memenuhi permintaan konsumen yang terus berubah setiap waktunya. Namun, dalam proses pengembangan produk tersebut, persyaratan keamanan pangan yang diatur oleh badan pengawas produk pangan tidak boleh diabaikan.

Industri pengolahan produk susu, terutama yang berbasis fermentasi, di seluruh dunia pun berusaha mencari cara baru dalam mengembangkan produk agar keinginan konsumen dapat terpenuhi. Keinginan konsumen yang ada di pasaran sangatlah beragam, mulai dari menginginkan produk dengan *flavor* yang lebih baik, kandungan bahan tambahan pangan yang sedikit, hingga produk dengan kandungan lemak atau kalori yang rendah. Untuk dapat memenuhi hal tersebut, diperlukan langkah untuk mendorong performa mikrobia yang bekerja dalam proses produk pangan dan diperlukan pula pengembangan *starter culture* agar didapatkan *starter culture* dengan sifat-sifat atau kemampuan yang baru.

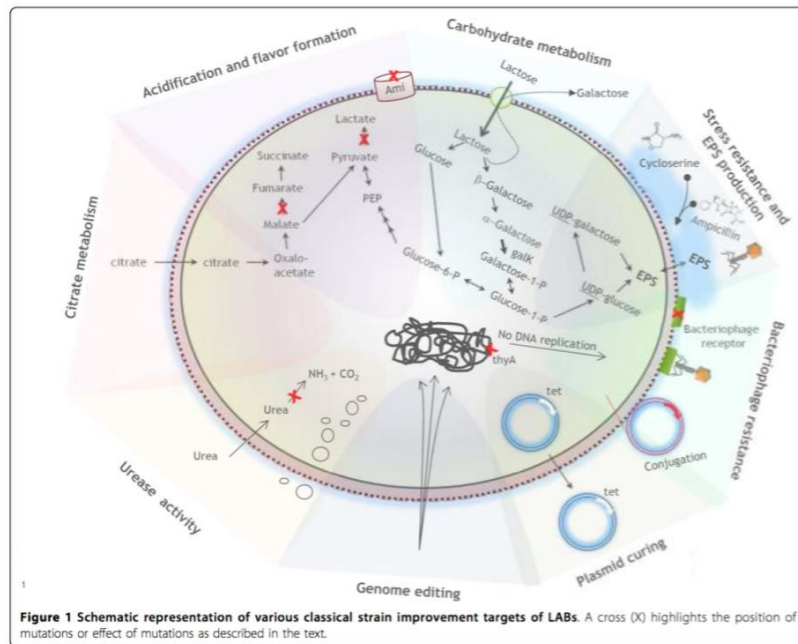
Bakteri asam laktat (BAL) merupakan organisme yang penting dalam industri pengolahan pangan dan sering digunakan sebagai *starter culture*, terutama pada produk pengolahan susu seperti yoghurt, keju, *buttermilk*, dan kefir. Selain fermentasi susu, bakteri asam laktat juga berperan penting dalam proses fermentasi sayuran, daging, ikan, sereal, dan dalam produksi minuman beralkohol. Selain memiliki fungsi pengawetan karena mampu menghambat pertumbuhan mikrobia pembusuk dengan menghasilkan asam organik, bakteri asam laktat juga mampu meningkatkan atribut sensoris dari produk, misalnya meningkatkan *flavor* dan tekstur.

Strain mikrobia yang sudah berada di alam memang memiliki sifat-sifat yang unik, namun untuk memanfaatkan potensialnya secara maksimal, sering kali diperlukan peningkatan kemampuan yang spesifik atau dilakukan eliminasi sifat yang tidak diinginkan pada mikrobia. Untuk memenuhi hal ini, rekombinan DNA merupakan teknologi yang ideal untuk meningkatkan performa mikrobia karena kerjanya yang presisi. Namun, badan pengawas pangan tidak mengizinkan metode tersebut digunakan dalam pengolahan pangan. Selain itu, tingkat penerimaan masyarakat terhadap produk pangan yang telah dimodifikasi secara genetik juga rendah. Oleh karena itu, saat ini, seluruh usaha untuk meningkatkan kemampuan *strain* untuk industri dilakukan dengan cara *natural* atau tanpa menggunakan teknologi rekombinan DNA, seperti *random mutagenesis*, *directed evolution*, dan *dominant selection*.

Directed evolution merupakan teknik yang menyebabkan suatu *strain* mikrobia mampu beradaptasi terhadap suatu kondisi. Teknik ini dapat memperkaya sifat dari mikrobia, namun terdapat risiko adanya akumulasi mutasi yang tidak diinginkan. Berikutnya, *dominant selection* dilakukan berdasarkan proses penyeleksian agar mikrobia dengan sifat yang diinginkan sajalah yang bisa tumbuh. Jika seleksi ini dilakukan dengan tepat, *strain* mikrobia dengan mutasi tunggal bisa didapatkan tanpa menggunakan *mutagenic agents*.

Di sisi lain, mekanisme *natural* atau alami seperti *bakteriophage transduction*, *natural competence*, dan konjugasi bisa dikatakan sebagai metode yang tepat karena berdasarkan peraturan di Uni Eropa, metode-metode tersebut tidak termasuk rekombinan DNA. Oleh

karena itu, akan dilakukan pembahasan lebih lanjut terhadap teknik *natural strain improvement* yang difokuskan terhadap *Lactococcus*, *Streptococcus*, dan *Lactobacillus* yang banyak digunakan untuk memfermentasi produk olahan susu. Berikut merupakan penjelasan dari metode-metode *strain improvement* yang tidak melibatkan rekombinasi DNA dari hasil prosiding berjudul *The Art of Strain Improvement of Industrial Lactic Acid Bacteria Without The Use of Recombinant DNA Technology*.



Gambar 10.1. Skema dari Berbagai Metode *Strain Improvement* pada BAL
 Sumber: Derkx, dkk. (2014)

Berdasarkan gambar 10.1. terdapat beberapa metode *strain improvement* tanpa melibatkan proses rekombinasi DNA yang saling berhubungan. Metode ini dilakukan untuk menghasilkan BAL yang resisten terhadap bakteriofag, resistensi stres dan produksi EPS-nya meningkat, metabolisme karbohidratnya meningkat, asidifikasinya diturunkan namun pembentukan *flavor*-nya meningkat, penghambatan metabolisme sitrat dapat dilakukan, dan peniadaan aktivitas urease dapat dilakukan. Berikut penjelasan lebih lanjut.

1. Resistensi BAL terhadap bakteriofag

Salah satu tantangan terbesar industri produk fermentasi susu ialah mencegah serangan bakteriofag. Secara alami, BAL telah memiliki sifat resistensi terhadap bakteriofag. Namun, meningkatkan kemampuannya menjadi sangat penting untuk dilakukan karena terdapat banyak sekali jenis bakteriofag yang mampu beradaptasi dengan mudah di berbagai kondisi pertumbuhan. Dapat dilakukan *plasmid curing* atau penghilangan plasmid (Spengler, dkk., 2006), inaktivasi gen yang mengkode PIP, dan konjugasi untuk membuat BAL resisten terhadap bakteriofag. Adapun penjelasannya ialah sebagai berikut.

A. Reseptor Bakteriofag

PIP protein (*Phage Infection Protein*) pada *Lactococcus* yang dikodekan oleh gen *pip* merupakan reseptor bakteriofag spesies *c2 prolate-headed* dan dipercayai dapat digunakan oleh seluruh bakteriofag *c2*. Sehingga, salah satu cara untuk membuat BAL resisten terhadap bakteriofag ialah dengan meniadakan reseptornya. Contohnya ialah menginaktivasi gen *yjaE*

yang diprediksi mengkode protein untuk domain protein infeksi fag terminal N- dan C. Satu hal yang penting ialah, inaktivasi gen *yjaE* tidak menyebabkan asidifikasi pada *strain L. lactis*. Sehingga, metode ini cocok untuk membuat kultur bakteri yang resisten terhadap bakteriofag tanpa mengganggu kerja dari kultur selama aplikasi proses pengolahan pangan.

B. Konjugasi

Pada gambar 10.1, terdapat bagian bertuliskan konjugasi. Konjugasi merupakan metode yang kerap diaplikasikan pada *L. lactis* untuk meningkatkan resistensinya terhadap bakteriofag, dimana sistem resistensi ini berpusat pada plasmid. Metode konjugasi ini akan mentransfer material genetik antar bakteri secara langsung (*cell-to-cell*). Contohnya, resistensi *L. lactis* CHCC1915 dan CHCC1916 terhadap bakteriofag ditingkatkan melalui transfer konjugatif plasmid pC11750 dari *L. lactis* UC653 yang memiliki sistem resistensi yang disebut *AbiG*. Infeksi yang abortif (virus memasuki sel inang namun replikasi tidak berhasil dilakukan) dikodekan oleh dua gen, yakni *abiGi* dan *abiGii*, dapat menyebabkan resistensi terhadap 936 spesies bakteriofag dan resistensi parsial terhadap c2 spesies bakteriofag.

C. Pyrimidine Auxotrophy

Berkebalikan dengan metode sebelumnya dimana sifat resisten tidak tersedia untuk seluruh bakteriofag yang menyerang suatu strain, terdapat metode yang memungkinkan terciptanya suatu strain yang benar-benar resisten terhadap bakteriofag dengan menghilangkan tahap replikasi DNA bakteriofag. *Thymidylate synthase* yang dikodekan oleh gen *thyA*, adalah suatu komponen yang penting dalam sintesis *de novo* dTTP. Dikarenakan produk susu tidak mengandung *thymidine*, replikasi DNA, termasuk DNA dari bakteriofag yang menginfeksi, dihilangkan oleh mutan *thyA*. Contohnya ialah MBP71, mutan *thyA* dari *L. lactis* CHCC373 menunjukkan resistensi yang menyeluruh terhadap 9 bakteriofag dari spesies 936 dan P335. Dikarenakan mutan *thyA* masih mampu mensintesis RNA dan protein maka mutan masih mampu melakukan aktivitas metabolisme.

2. Resistensi terhadap Stres dan Produksi EPS

Untuk membuat tekstur produk susu fermentasi seperti yang diinginkan, biasanya ditambahkan pektin dan pati ke dalam produk. Namun, penambahan ini menjadi tidak dibutuhkan karena strain BAL dapat dikembangkan untuk menghasilkan atribut tekstur tersebut, khususnya karena BAL mampu memproduksi *extracellular polysaccharides* (EPS). Selain itu, pada BAL yang diperuntukkan sebagai probiotik, bakteri harus mampu hidup pada sistem pencernaan manusia. Oleh karena itu, dibutuhkan metode untuk meningkatkan toleransi stres pada BAL. Berikut beberapa metode *natural strain improvement* untuk meningkatkan resistensi terhadap stress dan produksi EPS.

A. Modifikasi Permukaan Sel Bakteri

Permukaan sel bakteri merupakan bagian yang mengalami kontak secara langsung dengan lingkungan luar, sehingga diperkirakan bagian ini turut memengaruhi pembentukan tekstur selama susu difermentasi. Produksi EPS diketahui sangat bergantung dari jenis *strain* mikrobial dan berhubungan erat dengan kandungan gen *eps*. Selain dikarenakan oleh EPS, tekstur yang terbentuk pada susu selama proses fermentasi juga dipengaruhi oleh komponen lainnya pada permukaan sel bakteri.

Pada gambar 10.1., tertera *cycloserine* dan *ampicillin*. *Cycloserine* adalah antibiotik yang menghambat enzim yang terlibat dalam metabolisme D-alanin dan dapat menyebabkan sel lisis/pecah, sedangkan ampisilin ialah antibiotik yang menghambat transpeptidase untuk berikatan dengan peptidoglikan dan juga dapat menyebabkan sel lisis. Mutan berupa

Lactobacillus delbureckii subsp. *bulgaricus* yang memiliki resistensi terhadap D-cycloserine dan ampisilin menunjukkan kinerja dalam menekan sineresis whey setelah proses asidifikasi susu dan mampu meningkatkan atribut tekstur dari susu fermentasi. Hal ini menunjukkan bahwa perubahan atau modifikasi pada permukaan sel bakteri yang dilakukan sebelumnya akan memengaruhi interaksinya dengan lingkungan luar bakteri.

B. Bakteri yang Resisten terhadap Bakteriofag

Menurut Cescutti (2010), *bacterial polysaccharides* dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis, yakni *capsular polysaccharides* (CPS) dan *exopolysaccharides* (EPS). CPS merupakan polimer yang menempel pada permukaan sel melalui ikatan kovalen yang mampu melindungi bakteri dari serangan bakteriofag. Memilih strain yang memiliki CPS sehingga resisten terhadap bakteriofag dan juga menghasilkan EPS pada waktu yang sama dapat menghasilkan mutan yang mampu menghasilkan susu fermentasi dengan atribut tekstur yang lebih baik karena produksi EPS yang dihasilkan meningkat 20%. Contohnya ialah pada strain *S. thermophilus* CHCC11977.

C. Meningkatkan Resistensi terhadap Stres

Fermentasi *malolactic* yang dimediasi oleh BAL merupakan faktor penting dalam pengembangan flavor dari wine. Dalam beberapa tahun belakangan, kadar etanol dalam wine meningkat sebagai konsekuensi dari kadar gula yang juga meningkat akibat musim tumbuh anggur pada kondisi yang lebih hangat. Oleh karenanya, pengembangan strain BAL yang tahan terhadap kandungan etanol tinggi merupakan suatu keuntungan bagi industri. Mengubah struktur permukaan sel bakteri menyebabkan akses etanol untuk masuk ke dalam sel menurun, sehingga didapatkan strain bakteri yang lebih tahan terhadap etanol. Ketika keberhasilan strain probiotik berhubungan langsung dengan viabilitasnya pada usus manusia, strain *improvement* penting dilakukan untuk meningkatkan ketahanannya terhadap asam lambung dan empedu. Hal ini dapat diwujudkan melalui memodifikasi metabolisme gula dan memodifikasi komposisi dinding sel bakteri.

3. Metabolisme Karbohidrat

Sebagian besar strain *S. thermophilus* tidak dapat tumbuh pada substrat yang hanya mengandung galaktosa sebagai sumber karbonnya meskipun memiliki gen utuh yang dapat mengkode enzim yang diperlukan. Oleh karena itu, manipulasi genetik dapat dilakukan, misalnya pada *S. thermophilus* yang aktivitas enzim dalam jalur metabolisme galaktosanya ditingkatkan sehingga produksi EPS meningkat. Contoh lainnya ialah pada strain *S. thermophilus*, produksi EPS meningkat setelah aktivitas galatokinase ditingkatkan secara genetik. Selain itu, atribut tekstur pada susu fermentasi tidak hanya dipengaruhi oleh jumlah EPS yang disekresi, tetapi juga dipengaruhi oleh struktur EPS dan interaksi antarjenis EPS yang berbeda.

4. Asidifikasi dan Pembentukan Flavor

Terdapat berbagai strain BAL yang memproduksi asam laktat secara berkelanjutan saat penyimpanan produk, yang dikenal dengan *post-acidification*. Saat ini, konsumen menginginkan produk yoghurt dengan tingkat *post-acidification* yang rendah namun atribut teksturnya baik. Untuk bisa mendapatkan strain yang mampu menghasilkan produk seperti yang diinginkan tersebut, dapat dilakukan perubahan sistem transportasi oligopeptida yang terdiri dari tujuh protein (AmiA1, AmiA2, AmiA3, AmiC, AmiD, AmiE, dan AmiF). Kemudian, untuk menghasilkan flavor yang lebih baik, dapat digunakan salah satu analog kimia, yakni 3,4-dehydroproline yang akan mengubah prolin dan metabolisme glutamat pada *Lb.*

helveticus. Metode ini menyebabkan mutasi pada L-laktat dehidrogenase yang juga berfungsi sebagai dehidrogenase malat. Sehingga, hal ini menyebabkan fumarat dari hasil metabolisme sitrat tidak akan terbentuk, begitu juga suksinat.

5. Metabolisme Sitrat

Kemampuan katabolisis sitrat menjadi asetat dapat ditemukan pada berbagai jenis BAL, dan penggunaan dari sitrat biasanya berhubungan dengan produksi aseton dan diasetil. Senyawa ini mampu meningkatkan kualitas dari berbagai produk fermentasi, misalnya pada *buttermilk* dan beberapa produk keju, namun produksinya yang berlebih tidak diinginkan pada *wine* dan *cottage cheese*.

Akumulasi asetat dan diasetil dari hasil metabolisme sitrat dapat memberikan efek negatif terhadap atribut sensori *wine* yang difermentasi dengan *Oenococcus oeni*. Salah satu metode yang dapat digunakan ialah dengan *random mutagenesis* untuk mengeliminasi penggunaan sitrat. Hal ini menyebabkan mutasi pada gen transporter sitrat. Selain itu, dapat juga digunakan metode *plasmid curing*, dikarenakan kemampuan untuk menggunakan sitrat dikodekan oleh plasmid bakteri.

Kemampuan *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* dalam menggunakan sitrat juga dikodekan oleh plasmid. Penggunaan sitrat ini penting dalam menghasilkan flavor dan karbon dioksida pada *danbo*, *havarati*, dan *gouda cheese*, namun senyawa ini tidak diinginkan pada *cottage cheese*. Sehingga, plasmid sitrat pada *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyl* dapat dieleminasi kerjanya dengan memaparkan panas suhu tinggi (*heat-shock*) atau penambahan novobiocin.

6. Aktivitas Urease

Secara tradisional, *cottage cheese* dibuat dari susu yang difermentasi dengan *L. lactis*. Baru-baru ini, penggunaan *S. thermophilus* sebagai kultur starter pada *cottage cheese* semakin banyak digunakan karena proses asidifikasinya berjalan lebih cepat sehingga kapasitas produksi keju meningkat secara signifikan. Namun, *S. thermophilus* memiliki aktivitas amidohidrolase (urease) yang mengubah urea menjadi amonia dan karbon dioksida. Karbon dioksida ini akan berada di antara *curd* keju, sehingga proses *whay removal* jadi terhambat. Akibatnya, terdapat bagian yang menjadi *loss*. Untuk mengatasi hal ini, dapat dilakukan *random mutagenesis* untuk menghasilkan mutan *S. thermophilus* yang tidak memiliki urease, sehingga produksi ammonia bisa diturunkan sampai 90%.

DAFTAR PUSTAKA

- Actor, J. K. 2012. *11 – Basic Bacteriology*. Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology (Second Edition).
- Derkx, P. M. F., Janzen, T., Sorensen, K. I., Christensen, J. E., Stuer-Lauridsen, B., dan Johansen E. 2014. The Art of Strain Improvement of Industrial Lactic Acid Bacteria Without The Use of Recombinant DNA Technology. *Microbial Cell Factories*, 13 (55).
- Cescutti, P. 2010. Bacterial Capsular Polysaccharides and Exopolysaccharides. *Microbial Glycobiology*, page 93-108.
- Spengler, G., Molnar, A., Schelz, Z., Amaral, L., Sharples, D., Molnar, J. 2006. The Mechanism of Plasmid Curing in Bacteria. *Current Drug Targets*, 7 (7).
- Laman Web: Goodman, S. 1999. *Virology Study Sheet*.
<https://www.kumc.edu/AMA-MSS/Study/micro4.htm>.
Diakses pada 30 April 2020 Pukul 11.08 WIB.

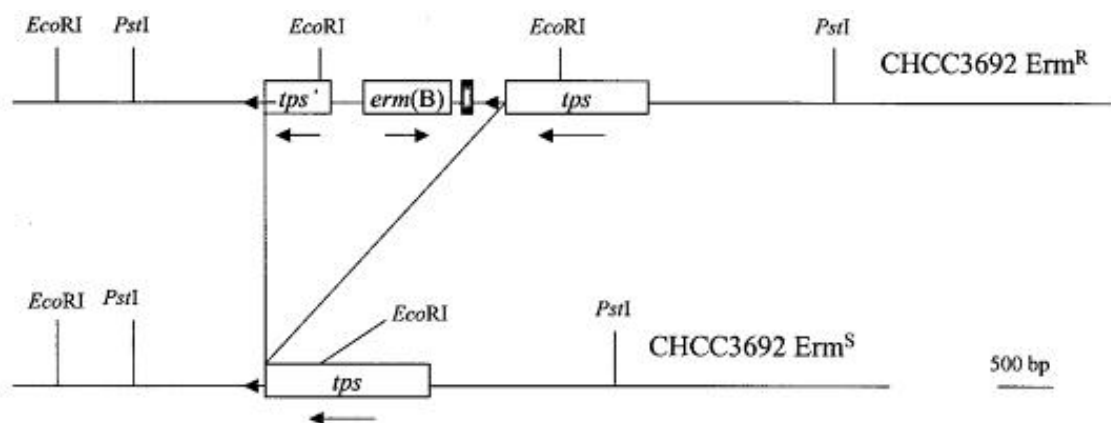
TOPIK 11
ELIMINASI SIFAT RESISTENSI ANTIBIOTIK PADA BAKTERI ASAM LAKTAT
(Anastasia Celestine - 17/414007/TP/11949)

Peningkatan resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik terus berkembang menjadi isu yang mengancam kesehatan publik. Resistensi terhadap antibiotik ini mampu diperoleh patogen melalui terjadinya mutasi atau adanya transfer gen pembawa sifat resistensi antibiotik dari mikrobia lain. Permasalahan ini perlu dipertimbangkan, terutama dalam pemanfaatan kultur mikrobia dalam proses pengolahan makanan. Salah satu kriteria penting dalam pemilihan kultur bakteri untuk industri pangan adalah aman bagi konsumen. Berdasarkan *Qualified Presumption of Safety (QPS)* yang ditetapkan oleh *European Food Safety Authority* di Eropa, sifat resistensi antibiotik yang dibawa oleh mikrobia perlu diidentifikasi untuk memperoleh status QPS. Hal ini dilatarbelakangi oleh resiko terjadinya transfer sifat resistensi mikrobia. Probiotik yang umumnya berada di saluran pencernaan manusia dan tidak berbahaya, juga mampu membawa resiko transfer sifat resistensi antibiotik ini terhadap bakteri patogen yang ada di saluran pencernaan. Resiko ini meningkatkan kesadaran untuk melakukan identifikasi terhadap sifat resistensi antibiotik pada mikrobia dan tingkat kemungkinan perpindahannya ke dalam makanan dan saluran pencernaan (Gueimonde dkk., 2013).

Terdapat bakteri probiotik yang secara alami mengandung sifat resistensi antibiotik; diantaranya terhadap antibiotik seperti *vanomycin*, *polymyxin*, *metronidazole*, *tetracycline*, *β -lactam antibiotics*, *macrolides* (misalnya *erythromycin*), *quinolone*, *aminoglycoside*, dan sebagainya. Sifat resistensi antibiotik yang dimiliki secara alami umumnya memiliki kemungkinan lebih rendah berpindah ke mikrobia lain, walau terkadang ada beberapa pengecualian jika gen resistensi ini diapit oleh deret insersi sehingga meningkatkan kemungkinan penyebaran. Di sisi lain, sifat resistensi antibiotik juga dapat diperoleh mikrobia dari sumber eksternal; seperti akibat mutasi kromosom atau memperoleh transfer DNA asing melalui transposon atau integron. Transfer genetik ini sering disebut *horizontal gene transfer (HGT)*. HGT pada mikrobia dapat didukung oleh 3 mekanisme utama; yaitu *naked DNA-mediated transformation*, transduksi yang disebabkan oleh bakteriofag, dan konjugasi melalui kontak langsung antar sel bakteri. Setelah bakteri memperoleh sifat resistensi, sifat tersebut akan menyebar dan berkembang ke kultur bakteri di sekitarnya. Mekanisme lain terjadinya perpindahan sifat resistensi antibiotik adalah melalui *MDR transporters* dan *efflux pumps* yang mampu memindahkan beberapa senyawa kimia sekaligus, termasuk antibiotik (Das dkk., 2019).

Kultur bakteri yang memiliki sifat resistensi yang tidak wajar (*atypical*) akan diidentifikasi lanjut dan bakteri yang memiliki kemungkinan tinggi dapat memindahkan sifat resistensi antibiotik akan ditangani dengan proses eliminasi atau inaktivasi terhadap gen resistensi antibiotik yang tidak diinginkan. Probabilitas terjadinya resiko perpindahan sifat resistensi antibiotik ini cukup tinggi, tetapi proses eliminasi umumnya juga akan mudah dilakukan karena sifat resistensi yang tidak alami umumnya bersifat tidak stabil. Gen pembawa sifat resistensi antibiotik biasanya terletak pada elemen *transposable* (mudah berpindah) atau pada plasmid (Derx dkk, 2014).

Terdapat beberapa metode yang dapat dilakukan untuk menghilangkan sifat resistensi pada bakteri asam laktat. Salah satunya adalah melalui perlakuan pemanasan (*heat shock*) pada suhu 60°C, yang dilakukan oleh Stroman dkk. (2003) pada *Lactobacillus crispatus* CHCC3692. Riset ini menunjukkan bahwa perlakuan pemanasan dapat mengurangi terjadinya ekspresi transposase dan menimbulkan pemotongan gen *erm(B)* dari kromosom, dimana *erm(B)* merupakan salah satu gen penentu resistensi terhadap antibiotik *erythromycin*. Pemanasan dapat mengurangi tingkat resistensi sel terhadap *erythromycin* sebanyak 40 kali lipat. Pemilihan suhu pemanasan 60°C digunakan agar tidak mempengaruhi sel bakteri secara signifikan tetapi cukup efektif dalam menghilangkan gen resistensi antibiotik yang terdapat dalam transposon yang didampangi elemen insersi (transposase).



Gambar 11.1. Outline Skema Transposon *erm(B)*, Tn3692 pada *L. crispatus* CHCC3692.

Bagian atas menunjukkan struktur relatif transposon *wild type* (Erm^R). Bagian bawah menunjukkan struktur setelah proses penghilangan elemen *erm* yang *transposable*. Panah menunjukkan arah berlangsungnya proses transkripsi (Stroman dkk., 2003).

Gen pembawa resistensi antibiotik bakteri asam laktat juga umum didapati terbawa pada plasmid, terutama pada isolat *Lactobacillus*. Terdapat beberapa metode untuk menghilangkan atau mengekstrak plasmid dari mikrobia, yang umumnya disebut teknik-teknik *plasmid curing*. Pada penelitian Vescovo dkk. (1981), terdapat 3 metode *curing* yang digunakan dalam pengujian yaitu meliputi 2 metode kimiawi dan 1 metode fisikawi: penggunaan *acriflavine*, penggunaan *ethidium bromide*, dan perlakuan pemanasan (46-49°C). Secara keseluruhan, metode *ethidium bromide* dan pemanasan cukup efektif dalam menghilangkan beberapa sifat resistensi antibiotik pada BAL (yang meliputi *L. reuteri* dan *L. acidophilus*). Hasil pengujian menunjukkan terdapat perubahan jumlah plasmid setelah perlakuan *curing*. Kultur D109 kehilangan seluruh plasmid, kultur 47S kehilangan 2 plasmid, kultur D111 kehilangan 4 plasmid, dan kultur D287 kehilangan 3 plasmid (keempatnya merupakan sampel kultur *L. reuteri*). Dilain pihak, kultur D137 kehilangan 4 plasmid, kultur 168S kehilangan 5 plasmid, dan kultur A274 kehilangan 2 plasmid (ketiganya merupakan sampel kultur *L. acidophilus*). Hasil tersebut dapat dilihat dari hasil uji *gel electrophoresis* profil plasmid pada saat sebelum dan setelah proses *curing* yaitu sebagai berikut.

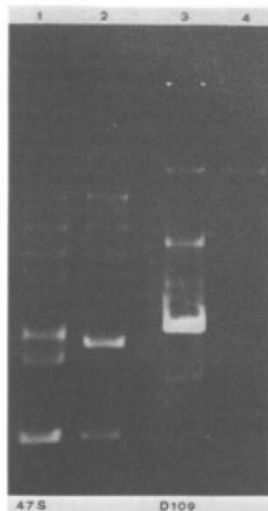


FIG. 2. Plasmid profiles of *L. reuteri* strains 47S and D109 before and after curing. (Well 1) 47S grown at 37°C; (well 2) 47S grown at 48°C; (well 3) D109 grown at 37°C; (well 4) D109 grown at 49°C.

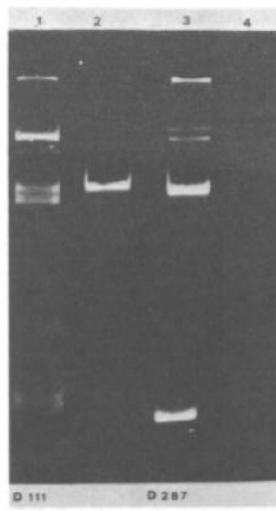


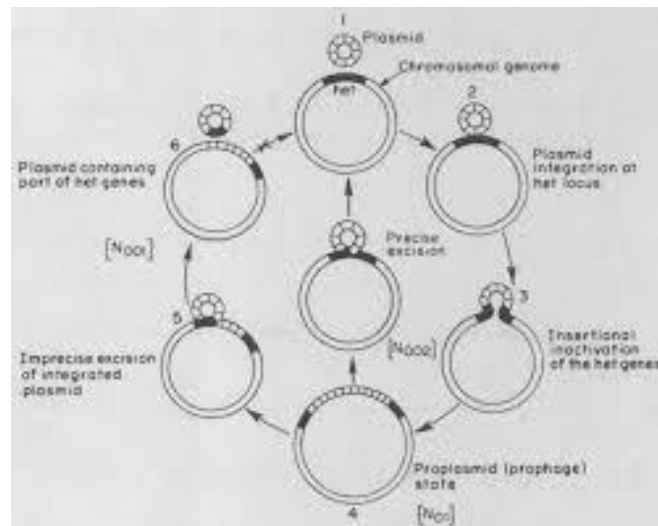
FIG. 3. Plasmid profiles of *L. reuteri* strains D111 and D287 before and after curing. (Well 1) D111 grown at 37°C; (well 2) D111 grown at 49°C; (well 3) D287 grown at 37°C; (well 4) D287 grown at 49°C.



FIG. 4. Plasmid profile of *L. acidophilus* strains D137 and 168S before and after curing. (Well 1) D137 grown at 37°C; (well 2) D137 grown at 49°C; (well 3) 168S grown at 37°C; (well 4) 168S grown at 48°C.

Gambar 11.2. Hasil Pengujian Profil Plasmid Kultur *L. reuteri* dan *L. acidophilus* pada saat Sebelum dan Sesudah Perlakuan *Curing* (Vescovo dkk., 1981). Tidak ditampilkan profil plasmid untuk kultur *L. acidophilus* A27.

Metode lain untuk eliminasi gen resisten antibiotik pada kultur juga dilakukan oleh Fons dkk. (1997) dengan metode *acridine orange* dan *mitomycin-C* pada kultur *L. fermentum* yang membawa gen resisten *erythromycin* (*erm*). Mekanisme kerja metode ini tidak dijelaskan secara rinci pada penelitian ini. Namun, ditemukan mekanisme *acridine orange* pada penelitian dengan topik serupa oleh Kumar dan Tripathi (1985). Berikut skema mekanisme tersebut.



Gambar 11.3. Mekanisme Kerja *Acridine Orange* (Kumar dan Tripathi, 1985)

Di luar penelitian-penelitian di atas, masih terdapat metode-metode lain yang dapat menghilangkan atau mengurangi ekspresi sifat resistensi antibiotik pada bakteri asam laktat. Pada penelitian oleh Huys dkk. (2006) yang melakukan *curing* plasmid secara kimiawi menggunakan *novobiocin* pada kultur *L. plantarum* strain CCUG 43738 yang membawa gen

resisten *tetracycline* [*tet(M)* dan *tet(S)*]. Ada pula penelitian oleh Vescovo dkk. (1984) yang melakukan *curing* plasmid pada kultur *L. reuteri* dengan metode formasi protoplas dan regenerasi. Metode *protoplast formation* ini pun terbukti oleh penelitian Rosander dkk. (2008) bahwa merupakan satu-satunya metode yang cocok untuk menghilangkan 2 plasmid pembawa gen resisten *tetracycline* [*tet(W)*] dan gen resisten *lincosamide* [*Inu(A)*] dari kultur *L. reuteri*. Selain itu, terdapat penelitian Anderson dan McKAY (1983) yang khusus berfokus pada metode isolasi secara sederhana dan cepat untuk DNA plasmid berukuran besar dari kultur *Lactic Streptococci* dengan menggunakan metode *alkaline lysis*. Metode ini menggunakan beberapa reagen kimia, yaitu sebagai berikut.

Tabel 11.1. Tahapan Proses *Alkaline Lysis* untuk Isolasi Plasmid (Anderson dan McKAY,1983)

Step	Details of following protocol:	
	Screening (1.5–10 ml) ^a	Preparative (600 ml) ^a
Resuspend pelleted cells in 6.7% sucrose–50 mM Tris–1 mM EDTA, pH 8.0	379 µl	30 ml
Warm to 37°C		
Add lysozyme (10 mg/ml in 25 mM Tris, pH 8.0)	96.5 µl	7.5 ml
Incubate for 5 min at 37°C		
Add 0.25 M EDTA–50 mM Tris, pH 8.0	48.2 µl	3.75 ml
Add sodium dodecyl sulfate (20% [wt/vol] in 50 mM Tris–20 mM EDTA, pH 8.0)	27.6 µl	2.25 ml
Mix immediately		
Incubate for 5 to 10 min at 37°C to complete lysis		
Vortex at highest setting for 30 s in an appropriate tube	1.5-ml Eppendorf	15 ml per tube (25 by 150 mm)
Add fresh 3.0 N NaOH	27.6 µl	2.40 ml
Mix gently by intermittent inversion or swirling for 10 min	Inversion	Swirl in 250-ml centrifuge bottle
Add 2.0 M Tris-hydrochloride, pH 7.0	49.6 µl	3.90 ml
Continue gentle mixing for 3 min		
Add 5.0 M NaCl	71.7 µl	5.7 ml
Add phenol saturated with 3% NaCl; mix thoroughly	700 µl	55.8 ml
Centrifuge	5 min	5,000 rpm in GSA rotor, 10 min
Remove upper phase and extract with chloroform-isoamyl alcohol (24:1)	700 µl	55.8 ml
Remove upper phase, precipitate with 1 vol of isopropanol		
Incubate at 0°C	>30 min	>60 min
Centrifuge	5 min	8,000 rpm in GSA rotor, 20 min
Remove excess isopropanol and resuspend in 10 mM Tris–1 mM EDTA, pH 7.5	20 µl	1,200 µl
Examine 5 to 10 µl by agarose gel electrophoresis		

^a The culture volume used in each protocol is indicated in parentheses.

Pada beberapa kasus, terdapat penelitian yang menguji secara khusus pelaksanaan proses eliminasi atau inaktivasi gen resistensi antibiotik yang belum terbukti *transmissible* atau tidak terletak di transposon atau plasmid. Salah satu contohnya dilakukan oleh Gueimonde dkk. (2010) terhadap gen resistensi *tetracycline* [*tet(W)*] yang umumnya dimiliki oleh semua kultur teridentifikasi *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*. Penelitian ini menerapkan mutagenesis menggunakan sinar UV pada sel yang ditumbuhkan dalam lingkungan mengandung *ethidium bromide*, sehingga diperoleh sel mutan pembawa gen *tet(W)* yang sensitif (tidak resisten) terhadap *tetracycline*, atau mengalami mutasi pada gen *tet(W)*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, D.G. dan McKAY, L.L. 1983. Simple and Rapid Method for Isolating Large Plasmid DNA from Lactic Streptococci. *Appl and Environmental Microbiology* Vol. 49, No. 3.
- Das, D.J., Shankar, A., Johnson, J.B., dan Thomas, S. 2019. Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*. *Nutrition* 69:110567.
- Derkx, P. M. F., Janzen, T., Sorensen, K. I., Christensen, J. E., Stuer-Lauridsen, B., dan Johansen E. 2014. The Art of Strain Improvement of Industrial Lactic Acid Bacteria without the Use of Recombinant DNA Technology. *Microbial Cell Factories*, 13:55.
- Fons, M., Hege T., Ladire M., Raibaud, P., Ducluzeau, R., dan Maguin, E. 1997. Isolation and characterization of a plasmid from *Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance. *Plasmid*, 57:199-203.
- Gueimonde, M., Florez, A., van Hoek, A., Stuer-Lauridsen, B., Strøman, P., Reyes-Gavilan, C., dan Margolles A. 2010. Genetic basis of tetracycline resistance in *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 76:3364-3369.
- Gueimonde, M., Sanchez, B., Reyes-Gavillan, C., dan Margolles, A. 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology* Vol. 4 Article 202.
- Huys G., D'Haene K., Swings J. 2006. Genetic basis of tetracycline and minocycline resistance in potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* strain CCUG 43738. *Antimicrob Agents Chemother*, 50:1550-1551.
- Kumar, H. dan Tripathi, A. 1985. MUTAGENIC AND PLASMID-ELIMINATING ACTION OF ACRIDINE ORANGE IN THE *CYANOBACTERIUM NOSTOC*. *Current Science*, 54(17), 845-852. Retrieved May 3, 2020, from www.jstor.org/stable/24087599.
- Rosander, A., Connolly, E., dan Roos, S. 2008. Removal of antibiotic resistance gene carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. *Appl Environ Microbiol*, 74:6032-6040.
- Stroman, P., Muller, C.C., dan Sorensen, K.I. 2003. Heat Shock Treatment Increases the Frequency of Loss of an Erythromycin Resistance-Encoding Transposable Element from the Chromosome of *Lactobacillus crispatus* CHCC3692. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 69, No. 12.
- Vescovo, M., Morelli, L., dan Bottazzi, V. 1981. Drug Resistance Plasmids in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri*. *Appl Environ Microbiol*, Vol. 43, No. 1.
- Vescovo, M., Morelli, L., dan Bottazzi, V. 1984. Protoplast formation, regeneration and plasmid curing in *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Microbiology Letter* 23 (1984) 333-334.

TOPIK 12
ELIMINASI METABOLISME SITRAT
(Bunga Khairina FA - 12/329632/TP/10362)

Bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme di bidang pangan yang digunakan sebagai kultur starter untuk menghasilkan produk makanan fermentasi mengandung susu seperti yoghurt, keju, buttermilk dan kefir. Fermentasi makanan adalah salah satu proses pengolahan makanan yang paling sederhana namun menghasilkan rasa khas pada produk akhirnya. Pada awalnya, pengertian fermentasi diartikan sebagai proses perubahan karbohidrat (gula) menjadi alkohol dan karbondioksida dengan bantuan *yeast*. Pada proses fermentasi, *yeast* beraktivitas menghasilkan alkohol, konsentrasi alkohol meningkat namun keberadaan produk fermentasi ini menjadikan *yeast* dalam kondisi tertekan (stress). Selain untuk meningkatkan rasa makanan dan gizi, fermentasi juga dilakukan untuk memberi umur lebih panjang pada produk yang dihasilkan. Bakteri asam laktat sendiri digunakan dalam fermentasi makanan karena sifatnya yang tergolong dalam kelompok bakteri Gram positif dan tidak membentuk spora. Bakteri ini juga memegang peranan penting dalam pembuatan minuman beralkohol dimana proses pembuatannya terdiri dari transformasi gula anggur (glukosa dan fruktosa) menjadi etanol dan CO₂. Selain memiliki efek pengawetan pada produk makanan dengan cara menghasilkan senyawa-senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan berbagai mikrobia penyebab pembusukan makanan, bakteri asam laktat juga mampu meningkatkan sifat organoleptik produk dengan memproduksi metabolit yang dapat meningkatkan rasa dan tekstur.

Bakteri asam laktat dibagi menjadi dua macam kelompok yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Kelompok homofermentatif merupakan kelompok bakteri asam laktat yang menggunakan glikolisis melalui jalur Embden Meyerhof Pathway (EMP) dan menghasilkan asam laktat sebesar 90% dengan sedikit produk samping berupa gliserol, etanol, asam asetat, asam format dan CO₂. Sedangkan golongan heterofermentatif merupakan kelompok bakteri asam laktat yang menggunakan jalur Hexosa Monophosphate Pathway (HMP) dan menghasilkan kurang dari 90% asam laktat dengan produk fermentasi lainnya berupa asam asetat, etanol, CO₂ dan sebagainya dengan rasio seimbang.

Mikroorganisme digunakan dalam fermentasi makanan karena memiliki banyak sifat yang diinginkan seperti produksi proteinase, metabolisme karbohidrat, transport sitrat, produksi eksopolisakarida, produksi bakteriosin dan resistensi terhadap bakteriofag. Namun di satu sisi, keberadaan sifat-sifat tersebut justru mungkin tidak diinginkan dalam rantai makanan dan beberapa sifat lainnya tidak diinginkan pada kondisi tertentu. Maka dilakukan penghapusan sifat-sifat yang tidak diinginkan dengan tujuan untuk meningkatkan sifat industri strain salah satunya ialah metabolisme sitrat yaitu suatu proses dimana sitrat bergerak dari matriks mitokondria ke dalam sitoplasma, kemudian dibelah membentuk asetil-CoA dan oksaloasetat oleh liase sitrat. Reaksi liase sitrat didorong oleh hidrolisis ATP. Sebagian besar oksaloasetat direduksi menjadi malat oleh malat *dehydrogenase*. Malat kemudian dapat dioksidasi menjadi piruvat dan CO oleh enzim malat. NADPH yang dihasilkan dalam reaksi ini digunakan dalam sitoplasma untuk proses biosintesis seperti sintesis asam lemak. Piruvat kemudian memasuki mitokondria yang dapat dikonversi menjadi oksaloasetat atau asetil-CoA. Sitrat merupakan activator alosterik dari reaksi pertama pada sintesis asam lemak. Ia merupakan inhibitor enzim PFK-1 sehingga kehadirannya dapat menghambat proses glikolisis yang merupakan satu-satunya sumber ATP dalam kondisi anaerobik.

Bakteri asam laktat memiliki kemampuan mengkatabolisis sitrat menjadi asetat, karbondioksida dan piruvat. Sitrat sendiri sering dikaitkan dengan produksi aseton dan diasetil. (Hugenholtz, 1993). Komponen-komponen tersebut merupakan komponen yang mampu meningkatkan sifat-sifat produk makanan fermentasi seperti *buttermilk* dan beberapa keju, sedangkan produksi yang berlebihan justru tidak diinginkan pada produk yang lain seperti anggur dan *cottage cheese*. Bakteri asam laktat dapat terdeteksi dalam wine karena bakteri asam laktat dapat berasal dari bahan baku. Bakteri *Oenococcus oeni* merupakan bakteri asam laktat tipe heterofermentatif yang berperan penting dalam fermentasi malolaktat pada proses pembuatan anggur. Bakteri ini melakukan fermentasi gula menjadi D(-) asam laktat, etanol, asam asetat dan karbondioksida melalui jalur *hexose-monophosphate* dan *phosphoketolase*. *Oenococcus oeni* sendiri dipilih karena beberapa alasan antara lain spesies ini kompatibel dengan yeast anggur utama, sebagian besar strain *O. oeni* toleran terhadap kadar pH anggur yang rendah dan biasanya toleran terhadap kadar alkohol standar yang dicapai sebagian besar anggur pada akhir fermentasi. Selain itu bakteri ini tidak dapat memetabolisme polisakarida dan alkohol karena gula dalam medium untuk pertumbuhannya berupa sukrosa, laktosa dan maltosa.

Fermentasi malolaktat di dalam proses pembuatan anggur oleh *Oenococcus oeni* ialah proses konversi enzimatis asam malat menjadi asam laktat dan karbondioksida. Proses konversi ini sering disebut juga reaksi dekarboksilasi *L-malic acid* menjadi *L-lactic acid* karena asam malat yang merupakan asam dikarboksilat diubah menjadi asam laktat yang monokarboksilat. Asam malat terbentuk dari proses glikolisis \rightarrow PeP \rightarrow Piruvat \rightarrow Acetil CoA \rightarrow asam malat (enzim *malate synthase* yang hanya dimiliki *yeast*) (KEGG, 2018). Pengurangan asam malat menjadi asam laktat bukanlah fermentasi yang sesungguhnya, melainkan reaksi enzimatis yang dilakukan oleh bakteri asam laktat (BAL) setelah fase pertumbuhan eksponensialnya. Perubahan struktur ini akan menurunkan kadar total keasaman dan menaikkan pH antara 0,3 sampai 0,5 yang menjadikan rasa anggur lebih ringan, halus, lembut dan lebih menarik di mulut sehingga meningkatkan kualitas organoleptik wine. Selain itu, fermentasi malolaktat juga meningkatkan aroma *fruity* pada wine karena adanya pembentukan etil ester dari asam lemak oleh bakteri asam laktat (Maarse, 1991).

Fermentasi malolaktat sangat berperan penting dalam pembuatan wine khususnya untuk meningkatkan kualitas dan kompleksitas wine. Fermentasi ini dikenal sebagai *secondary fermentation* setelah fermentasi alkoholik oleh *yeast*. Peran utama bakteri asam laktat dalam fermentasi malolaktat yaitu mengubah asam-asam monokarboksilat dan karbondioksida. Selama fermentasi malolaktat, akumulasi asetat dan diasetil yang dihasilkan dari metabolisme sitrat dapat berdampak negatif pada sifat-sifat sensorik. (Bartowsky, 2004). Diasetil adalah produk antara proses metabolisme asam sitrat ketika semua asam malat telah dikonsumsi. Diasetil diproduksi secara alami oleh bakteri asam laktat terutama *L. lactis* biovar, *diacetylactis*, dari sitrat dalam *co-fermentation* dengan laktosa. Senyawa metabolit yang tidak diinginkan ini merupakan senyawa diketon aromatik yang memberikan aroma *buttery* atau *nutty* pada wine, yang mana dianggap sebagai cacat. Wine yang mengalami konversi malolaktat akan berwarna keruh karena kehadiran bakteri dan sel *yeast* serta senyawa-senyawa lain yang tersuspensi di dalamnya, kemudian wine mungkin akan berbau mentega akibat dari produksi diasetil juga meningkatnya asam-asam volatil dalam wine akibat dari adanya bakteri asetat atau laktat heterofermentatif yang dihasilkan pada saat fermentasi yang akan mempengaruhi aroma dari wine (Jackson, 2008).

Karena nilainya sebagai senyawa aroma, efisiensi produksi diasetil oleh laktosa daripada sitrat menjadi tujuan dari beberapa strategi rekayasa metabolisme. Namun diasetil merupakan senyawa tidak stabil sehingga dapat direduksi kembali oleh sel *Oenococcus oeni* dan *yeast*. Untuk mencegah wine memiliki cacat berupa aroma *butter* maka dilakukan mutagenesis acak untuk menghilangkan plasmid pemanfaatan sitrat dari strain *O. oeni* komersial penyebab aroma mentega yang tidak diinginkan keberadaannya pada produksi wine. Mutagenesis acak adalah alat yang ampuh untuk menghasilkan enzim, protein, seluruh jalur metabolisme atau bahkan seluruh genom dengan sifat yang diinginkan atau ditingkatkan, yang memungkinkan penghapusan hingga 16 basis dari titik acak pada gen target dan penyisipan berikutnya dari urutan acak atau yang telah ditentukan dari sejumlah basis pada posisi yang sama. Ada beberapa kelemahan dari metode ini yaitu tidak adanya target yang spesifik dan akan diperkenalkan berbagai mutasi acak ke dalam genom yang diinginkan, setelah itu diperlukan karakterisasi dan pemilihan substrat varian target sehingga dapat terjadi mutasi yang tidak diinginkan yang memerlukan karakterisasi lebih lanjut dari strain yang diisolasi. Hasil variasi mengandung mutasi tidak wajar pada gen transporter sitrat. Kemampuan untuk memanfaatkan sitrat dalam *O. oeni* dikodekan dengan plasmid bakteri sehingga digunakan metode plasmid *curing*.

Untuk mendapatkan BAL mutan dengan fungsi yang diinginkan dalam pembuatan wine, mutagenesis fisika dan kimia acak diterapkan dalam industri bioteknologi untuk mengevaluasi fungsi dan fenotipnya. Mutagenesis acak dicapai dengan menyisipkan atau menghapuskan nukleotida dari urutan gen target. Penyisipan acak dilakukan dengan mengeksploitasi elemen *transposable* yang terjadi secara alami dimana ekor peptide dipadukan ke sebuah gen. Elemen-elemen *transposable* memiliki beberapa keuntungan bagi mutagenesis acak antara lain transposon, dapat dirancang untuk membawa penanda yang dapat dipilih seperti resistensi antibiotik atau kekebalan fag. Terjadinya penyisipan transposon dapat dikendalikan, mutagenesis terjadi dengan sangat efisien dan peluang terjadinya mutasi sekunder rendah.

Dalam pembuatan wine, sifat bakteri mutan yang diharapkan adalah dalam hal memetabolisme sitrat karena proses metabolisme sitrat merupakan proses penghasil senyawa diasetil penyebab aroma mentega yang dapat dikategorikan sebagai salah satu sifat yang tidak diinginkan keberadaannya pada wine. Untuk itu perlu dilakukan eliminasi pada kemampuan metabolisme sitrat oleh *O. oeni* agar dihasilkan wine dengan aroma yang khas. Rekayasa metabolisme bakteri asam laktat secara genetik yang memungkinkan modifikasi jalur metabolisme yang ada, untuk meningkatkan sifat-sifat bakteri asam laktat sebagai pemegang peran penting pada fermentasi makanan, dilakukan dengan cara mengadakan penggantian atau penghapusan pasangan basa tunggal di urutan situs yang mungkin dianggap tidak diinginkan untuk aplikasi makanan kemudian dikeluarkan atau diganti dengan DNA dari strain atau spesies lain. Kemampuan *L. lactis* subsp. *Lactis* biovar *diacetylactis* untuk memanfaatkan sitrat juga disandikan oleh plasmid. Senyawa diasetil diproduksi secara alami oleh bakteri asam laktat dari sitrat dalam *co-fermentation* dengan laktosa. Produk antara dari fermentasi yaitu *α -asetolactate* adalah prekursor kimia untuk diasetil yang dapat dikonversi melalui reaksi dekarboksilasi oksidatif. Bakteri ini memanfaatkan sitrat untuk menghasilkan diasetil selama fermentasi susu dalam produksi mentega, *buttermilk* dan beberapa keju sementara diasetil menghasilkan aroma mentega khas dalam produk-produk ini (Davidson *et al.*, 1995). Senyawa ini penting untuk produksi komponen rasa dan karbondioksida dalam keju seperti Danbo, Havarti dan Gouda, namun justru tidak diinginkan keberadaannya dalam produksi *cottage cheese* sehingga eliminasi plasmid sitrat dalam *L. lactis* subsp. *lactis* biovar

diacetylactis dapat dicapai dengan perlakuan *heat-shock* atau pemaparan pada panas dengan suhu tinggi dan perlakuan menggunakan *novobiocin* yaitu senyawa antibiotik yang berasal dari *Streptomyces niveus* yang dapat menghambat sintesis dinding bakteri, DNA, RNA dan protein, sehingga menghasilkan strain yang berguna untuk produksi *cottage cheese*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bartowsky EJ, Henschke PA. (2004). The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *Int J Food Microbiol* , 96:235-52.
- Davidson, B.E., Llanos, R.M., Cancilla. M.R., Redman, N.C., Hillier, A.J. (1995). Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*
- Hugenholtz J. (1993). Citrate metabolism in lactis acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 12:165-178
- Jackson, R.S. (2008). Wine Science 3rd Editions: Principle and Applications (Food Science and Technology). *Academic Press*: USA
- Maarse H. (1991). Volatile Compounds in Foods and Beverages. *New York*: Dekker
- KEGG (2018). Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.
http://www.genome.jp/dbgetbin/www_bget?sce:YIR031C+sce:YNL117W.
Diakses pada 2 Mei 2020 Pukul 21.24

TOPIK 13
PENINGKATAN TOLERANSI TERHADAP ETANOL DAN BILE SALT
(M. Fauzan Kennedy - 17/415286/TP/12022)

Peningkatan Toleransi terhadap Etanol

Permintaan dunia untuk bioetanol semakin meningkat sebagai akibat dari ketersediaan bahan bakar fosil yang rendah dan meningkatnya mobil bahan bakar fleksibel etanol. Negara-negara di beberapa bagian dunia telah sepakat untuk mengurangi emisi karbon dioksida, dan penggunaan etanol sebagai bahan bakar (menghasilkan lebih sedikit polutan daripada minyak bumi) telah dianggap sebagai alternatif yang baik untuk mencapainya. Besarnya volume etanol yang diproduksi dan diperdagangkan setiap tahun mendorong evaluasi dan setiap perbaikan kecil dalam proses. Perbaikan kecil tersebut dapat sangat berarti dan dapat mewakili penghematan miliaran dolar.

Banyak upaya di berbagai bidang telah dilakukan sehubungan dengan ekspansi bioetanol, seperti peningkatan substrat untuk meningkatkan produktivitas dan kinerja fermentasi mikroorganisme (Matsutani *et al.*, 1992), modifikasi gen untuk membantu mikroorganisme dalam mengatasi stres yang disebabkan oleh pemrosesan industri (Zheng *et al.*, 2011), dan lainnya. Proses produksi etanol menggunakan tebu sebagai substrat bagi mikroorganisme. Mikroorganisme tersebut akan tumbuh pada kepadatan seluler tinggi dan suhu tinggi di tangki terbuka berkapasitas besar. Kondisi tersebut mendorong mikroorganisme untuk mengatasi beberapa jenis stres. Salah satu pemicu utamanya adalah suhu tinggi dan konsentrasi etanol tinggi di dalam tangki fermentasi selama produksi alkohol (Cavalheiro and Monteiro, 2013).

Disisi lain, fermentasi malolaktik oleh bakteri asam laktat (BAL) sangat mempengaruhi pembentukan rasa dalam proses pembuatan wine. Proses tersebut didasarkan pada dekarboksilasi L – asam malat menjadi L – asam laktat dan CO₂ yang mengakibatkan penurunan keasaman wine. Fermentasi malolaktik dapat berlangsung selama atau setelah proses fermentasi oleh yeast yang menghasilkan etanol (Sorensen, *et al.*, 2012). Peningkatan suhu global menyebabkan musim tanam anggur yang lebih hangat dan menghasilkan anggur dengan kadar gula yang lebih tinggi. Hal tersebut menyebabkan kadar etanol meningkat dan mempengaruhi proses fermentasi wine. Oleh karena itu, pengembangan mikroorganisme resisten terhadap kadar etanol tinggi yang berperan dalam produksi etanol dan fermentasi pada wine akan sangat bermanfaat dalam industri.

Peningkatan toleransi pada mikroorganisme dapat diperoleh dengan menerapkan adaptasi mikroorganisme terhadap tekanan lingkungan tertentu, tetapi adaptasi mikroorganisme hanya berlangsung sementara. Teknik lainnya yang dapat digunakan untuk meningkatkan toleransi pada mikroorganisme dapat diperoleh melalui rekayasa genetika. Berdasarkan karakterisasi mutan *Lb. plantarum* yang resisten terhadap *D-cycloserine*, diperoleh sejumlah *phenotypes* yang tidak terduga. Sejumlah mutan ditemukan secara signifikan lebih toleran terhadap etanol daripada strain induk. Hal tersebut menunjukkan bahwa perubahan pada permukaan sel mengakibatkan berkurangnya akses etanol ke membran sel sehingga menghasilkan peningkatan toleransi etanol (Derks, *et al.*, 2014). Selain itu, masih banyak lagi teknologi yang dapat diterapkan dalam meningkatkan toleransi mikroorganisme terhadap etanol. Salah satu adalah meningkatkan toleransi alkohol dengan memanfaatkan teknologi OMICS, termasuk transkriptomik, proteomik, metabolomik, dan teknologi genomik dalam memahami mekanisme yang mendasari toksisitas alkohol. Hal tersebut dapat dijadikan dasar untuk merekayasa strain yang toleran terhadap alkohol (Horinouchi, *et al.*, 2018).

Peningkatan Toleransi terhadap *Bile Salt*

Manusia dikolonisasi oleh kumpulan mikroorganisme yang kompleks dan dinamis dengan jumlah yang melebihi jumlah sel somatik manusia. Namun, komponen mikrobiota pada manusia masih kurang diidentifikasi dan dikarakterisasi. Beberapa penelitian terbaru menunjukkan bahwa mikroorganisme dari saluran pencernaan manusia yang telah diidentifikasi berjumlah lebih dari 100 filum, yang mewakili lebih dari 7.000 strain dan termasuk dalam delapan filum utama. Komposisi mikroorganisme tersebut adalah hasil dari tekanan selektif yang dipaksakan oleh inang, lalu mengalami seleksi kembali oleh persaingan antara mikroorganisme penyusun.

Interaksi antara berbagai mikroorganisme dan inang manusia sangat beragam mulai dari simbiosis mutualisme, simbiosis komensalisme hingga patogenesis. Saluran pencernaan manusia dan mikroorganisme memiliki interaksi koevolusi adaptif yang dapat mengarah pada pengembangan hubungan komensal atau hubungan simbiotik. Mikroorganisme pada saluran pencernaan manusia berkontribusi terhadap kondisi inang dan berdampak pada proliferasi dan diferensiasi sel usus, pH, pengembangan sistem kekebalan tubuh dan respon terhadap patogen. Selanjutnya, mikroorganisme tersebut akan dikenal sebagai probiotik karena dapat meningkatkan kesehatan inang dan menyeimbangkan mikroflora dalam saluran pencernaan apabila dikonsumsi dalam jumlah yang cukup (Ventura, *et al.*, 2009).

Bakteri probiotik merupakan mikroorganisme non patogen, yang jika dikonsumsi memberikan pengaruh positif terhadap fisiologi dan kesehatan inangnya (Schrezenmeir and de Vrese, 2001). Senyawa-senyawa racun yang dihasilkan dari metabolisme protein dan lemak, serta hasil pemecahan enzim tertentu semakin berkurang apabila bakteri probiotik mulai menjalankan peranannya dalam meningkatkan kesehatan. Berbagai senyawa hasil metabolisme juga memberikan efek positif bagi inang, seperti asam laktat, H₂O₂, bakteriosin yang bersifat antimikroba dan berbagai enzim yang dimilikinya seperti laktase (membantu mengatasi intoleransi terhadap laktosa) serta *bile salt hydrolase* (membantu menurunkan kolesterol) serta adanya aktivitas antikarsinogenik dan stimulasi imun sistem. Persyaratan penting bagi bakteri probiotik adalah resistensi terhadap kondisi saluran pencernaan, salah satunya adalah resistensi terhadap *bile salt* (Nagao *et al.*, 2000).

Garam empedu (*bile salt*) merupakan senyawa amphipatik, salah satu sisinya dapat larut dalam air (hidrofilik) dan sisi yang lainnya tidak larut dalam air (hidrofobik). Struktur amphipatik inilah yang menyebabkan *bile salt* mampu mengemulsifikasi lemak dan mempengaruhi aktivitas mikroorganisme dalam saluran pencernaan, khususnya ketika berada di usus halus. *Bile salt* di dalam usus halus mampu melarutkan fosfolipid, kolesterol dan protein pada mikroorganisme. Sebagian besar dari senyawa tersebut dapat menyusun membran sel, sehingga menyebabkan sel mikroorganisme menjadi hancur (lisis). Konsentrasi *bile salt* yang tinggi dapat menjadi racun dan zat anti-mikrobia (Begley *et al.*, 2002).

Toleransi terhadap *bile salt* adalah salah satu sifat paling penting bagi bakteri probiotik karena menentukan kemampuannya untuk bertahan hidup di usus kecil, dan akibatnya kapasitasnya untuk memainkan peran fungsionalnya sebagai probiotik. Meskipun toleransi terhadap *bile salt* tampaknya tergantung pada strain, namun beberapa strain mikroorganisme dapat secara progresif beradaptasi dengan keberadaan *bile salt* dan menghasilkan turunan yang resisten dengan mensubkultur secara bertahap meningkatkan konsentrasi *bile salt*. Pada beberapa penelitian, strain yang resisten terhadap *bile salt* juga dapat diperoleh dengan memilih kondisi stres lainnya, seperti pH asam, dan strain yang diadaptasi dengan *bile salt* biasanya menampilkan resistensi silang terhadap faktor stres lainnya. Hal tersebut

mencerminkan adanya mekanisme umum dalam respons bakteri terhadap berbagai tekanan dan menunjukkan bahwa peningkatan toleransi empedu probiotik dapat membantu mengembangkan strain yang lebih kuat yang menunjukkan peningkatan resistensi terhadap faktor teknologi atau gastrointestinal lain yang membahayakan kelangsungan hidup probiotik (Ruiz, 2013).

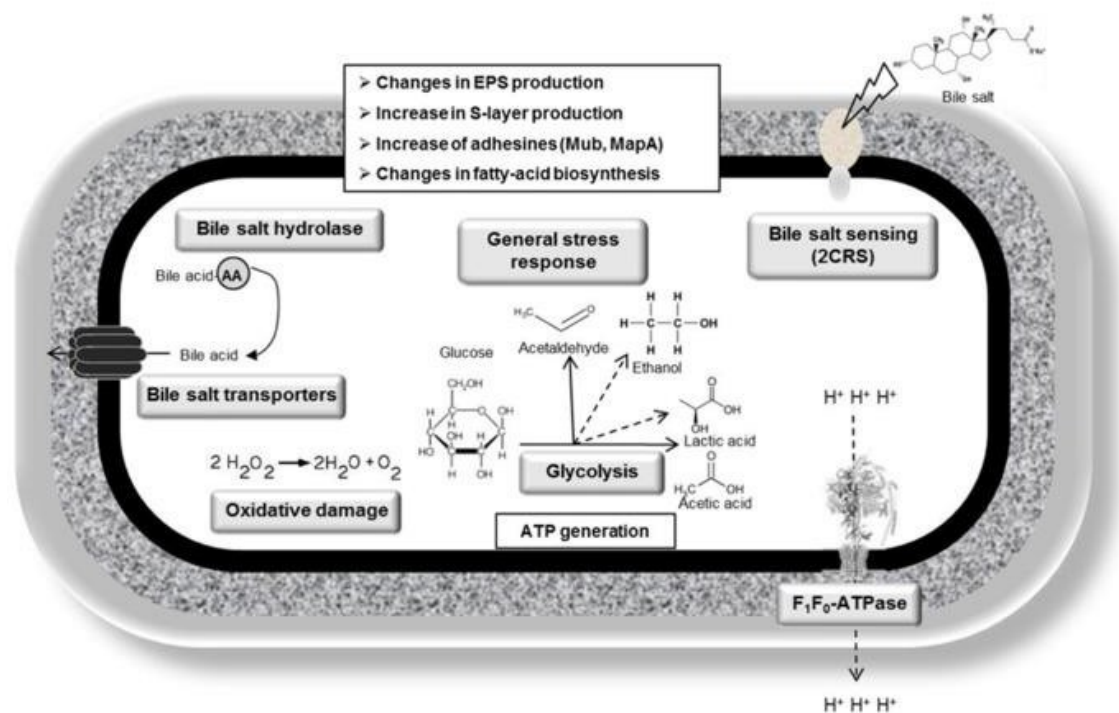
Strain yang diadaptasi empedu juga menyediakan model yang menarik untuk menganalisis mekanisme molekuler yang terlibat dalam toleransi bakteri dan respons terhadap senyawa-senyawa ini. Secara keseluruhan, respons empedu adalah fenomena multifaktorial yang melibatkan berbagai proses yang ditujukan untuk detoksifikasi empedu dan menangkal efek buruk pada struktur bakteri. Pengeluaran aktif asam empedu/garam, hidrolisis garam empedu, dan perubahan dalam komposisi membran sel dan dinding sel tampaknya menjadi mekanisme spesifik empedu yang paling umum yang memediasi resistensi di keduanya genera. Selain itu, respons stres umum, perlindungan terhadap kerusakan oksidatif, serta reorganisasi glikolitik global adalah konsekuensi umum lain dari paparan empedu, yang dapat digunakan untuk menetralkan beberapa kerusakan seluler yang disebabkan oleh senyawa-senyawa ini (Ruiz, 2013). Berikut merupakan mekanisme respons *Lactobacilli* terhadap *bile salt* (Gambar 13.1).

Strain probiotik berkaitan erat dengan viabilitas mikroorganisme tersebut dalam saluran pencernaan. Peningkatan strain probiotik dapat mencakup peningkatan kelangsungan hidup setelah paparan asam lambung dan empedu. Beberapa mekanisme diusulkan untuk menjelaskan meningkatkan resistensi strain probiotik terhadap empedu termasuk penghabisan asam empedu / garam, metabolisme gula yang dimodifikasi, dan membran sel atau modifikasi komposisi dinding sel. Rekayasa genetika juga diterapkan untuk meningkatkan toleransi strain probiotik terhadap *bile salt*. Mutan strain *Lactobacillus* yang berpotensi probiotik dan resisten terhadap *D-cycloserine*. Hasil percobaan tersebut menunjukkan bahwa beberapa mutan yang resisten terhadap *D-cycloserine* memiliki tingkat ketahanan hidup yang lebih tinggi daripada strain induk ketika terpapar oleh *bile salt*. Analisis urutan genom menunjukkan mutasi unik terjadi pada setiap strain, meskipun tidak semua berkaitan dengan resistansi *D-cycloserine*. Selain itu, diketahui pula untuk beberapa isolat yang toleran terhadap *bile salt* tidak mengalami perubahan pada karakteristik *in vitro* lain yang digunakan untuk mengevaluasi potensi probiotik (Sorensen, *et al.*, 2012).

DAFTAR PUSTAKA

- Begley, M., C. G. M. Gahan, and C. Hill. 2002. *Bile Stress Response In Listeria monocytogenes LO28: Adaptation, Cross-Protection, And Identification Of Genetic Loci Involved In Bile Resistance*. Appl. Environ. Microbiol. 68:6005-6012
- Cavalheiro, A.A., Monteiro, G., *Solving Ethanol Production Problems with Genetically Modified Yeast Strains*. Braz J Microbiol. 2013; 44(3): 665–671
- Derkx, P., Janzen, T., Sorensen, K., Christensen, J., Stue- Lauridsen, B., Johansen, E. 2014. *The Art of Strain Improvement of Industrial Lactic Acid Bacteria without the Use of Recombinant DNA Technology*. Microbial Cell Factories. Proceedings: 11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria.
- Horinouchi, T., Maeda, T., Furusawa, C. 2018. *Understanding and Engineering Alcohol-Tolerant Bacteria using OMICS Technology*. World J Microbiol Biotechnol. 2018; 34(11): 157.

- Nagao, F., M. Nakayama, T. Muto and K. Okumura. 2000. *Effects of a Fermented Milk Drink Containing Lactobacillus casei Strain Shirota on the Immune System in Healthy Human Subjects*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64 (12): 2706-2708.
- Matsutani K, Fukuda Y, Mutrata K, Kimura A, Yajima N. *Adaptation Mechanism of Yeast to Extreme Environments: Construction of Salt-tolerance Mutants of the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferm Bioeng*. 1992;73:228–229.
- Ruiz, L., Margolles, A., Sánchez, B. 2013. *Bile Resistance Mechanisms in Lactobacillus and Bifidobacterium*. *Front Microbiol* 2013, 24:396.
- Schrezenmeir, J., and de Vrese, M. 2001. *Probiotics, Prebiotics and Synbiotics*. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 361S-364S.
- Sorensen, K., Kibenich, A., Johansen, E. 2012. *Lactobacillus plantarum Cells with Improved Resistance to High Concentrations of Ethanol*. 2012, International Patent Application WO/2012/172000. 59.
- Van Bokhorst-van de Veen, H., Smelt, M.J., Wels, M., van Hijum, S.A., de Vos, P., Kleerebezem, M., Bron, P.A., 2013. *Genotypic Adaptations Associated with Prolonged Persistence of Lactobacillus plantarum in the Murine Digestive Tract*. *Biotechnol J* 2013, 8:895-904. 61.
- Ventura, M., O’Flaherty, S., Claesson, M.J., Turrone, F., Klaenhammer, T.R., van Sinderen, D., O’Toole, P.W. 2009. *Genome Scale Analyses of Health Promoting Bacteria: Probiogenomics*. *Nat Rev Microbiol* 2009, 7:61-71. 60.
- Zheng DQ, Wu XC, Tao XL, Wang PM, Li P, Chi XQ. *Screening and Construction of Saccharomyces cerevisiae Strains with Improved Multi-tolerance and Bioethanol Fermentation Performance*. *Bioresour Technol*. 2011;102:3020–3027.



Gambar 13.1. Mekanisme respons *Lactobacilli* terhadap *bile salt* (Ruiz, 2011)

TOPIK 14
GENOME EDITING DAN APLIKASINYA PADA BAL
(FERMENTASI DAN PROBIOTIK)
(Okta Cesario Eka Dhanar Wijaya - 17/414031/TP/11973)

Genome Editing

Teknologi *genome editing* merupakan metode rekayasa biologi molekuler yang pendekatannya disinyalir lebih baik dari teknologi manipulasi gen secara transgenesis klasik, seperti mengintroduksi sifat baru pada tanaman atau hewan dengan rekombinasi genetik alami dengan cara mengawinkan dengan induk yang lebih baik atau unggul. *Genome editing* adalah metode perakitan genetik dimana sebuah sekuens DNA bisa disisipkan, diganti, dihapus, dan atau dipindahkan dari genom suatu organisme ke organisme lain dengan bantuan suatu enzim nuklease yang berfungsi seperti gunting molekuler (Schinkel & Schillberg, 2016). Tujuan dari metode ini tak lain adalah mengedit susunan basa DNA pada genom sehingga ketika diterjemahkan dalam bahasa asam amino bisa merubah sifat dari organisme tersebut.

Teknologi *genome editing* generasi awal menggunakan perantara oligonukleotida (*oligonucleotide-mediated mutagenesis*, OMM), yang disintesis secara kimiawi dan berfungsi untuk membantu enzim pemulihan DNA dalam menemukan situs spesifik gen dan melakukan penggantian atau penambahan basa DNA (Beetham *et al.* 1999). Saat ini, generasi terbaru teknologi *genome editing* menggunakan enzim nuklease yang telah dimodifikasi dengan situs terarah (*site-directed nucleases*, SDNs; atau kadang-kadang disebut juga *site-specific nucleases*, SSNs), yang mampu melakukan penargetan sangat spesifik pada gen yang diinginkan. Pemotongan utas ganda DNA (*double strand breaks*, DSBs) oleh enzim SDN akan memicu mekanisme perbaikan/reparasi DNA di dalam sel tersebut. Jenis reparasi yang dilakukan sel selanjutnya dapat diarahkan untuk menghasilkan sejumlah modifikasi sekuens DNA, baik berupa penghilangan sekuens DNA (delesi) maupun penyisipan (insersi) DNA baru dalam berbagai ukuran (Puchta dan Fauser 2013).

Kelas utama SDN diketahui ada empat, yaitu *meganuclease* (MegaN), *zinc finger nucleases* (ZFNs), *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs), dan *CRISPR/Cas9* (Abdallah, *et al.* 2015) :

MegaN adalah endonuklease alami yang dapat mengenali dan memotong sekuens DNA berukuran besar (12–40 bp). Setelah pemotongan terjadi, sel akan mengalami reparasi DNA secara alami untuk rekombinasi atau induksi insersi dan delesi (indel). Kelemahan MegaN berupa keterbatasan variasi enzim tersebut dan sekuens targetnya tidak banyak mencakup lokus-lokus yang penting.

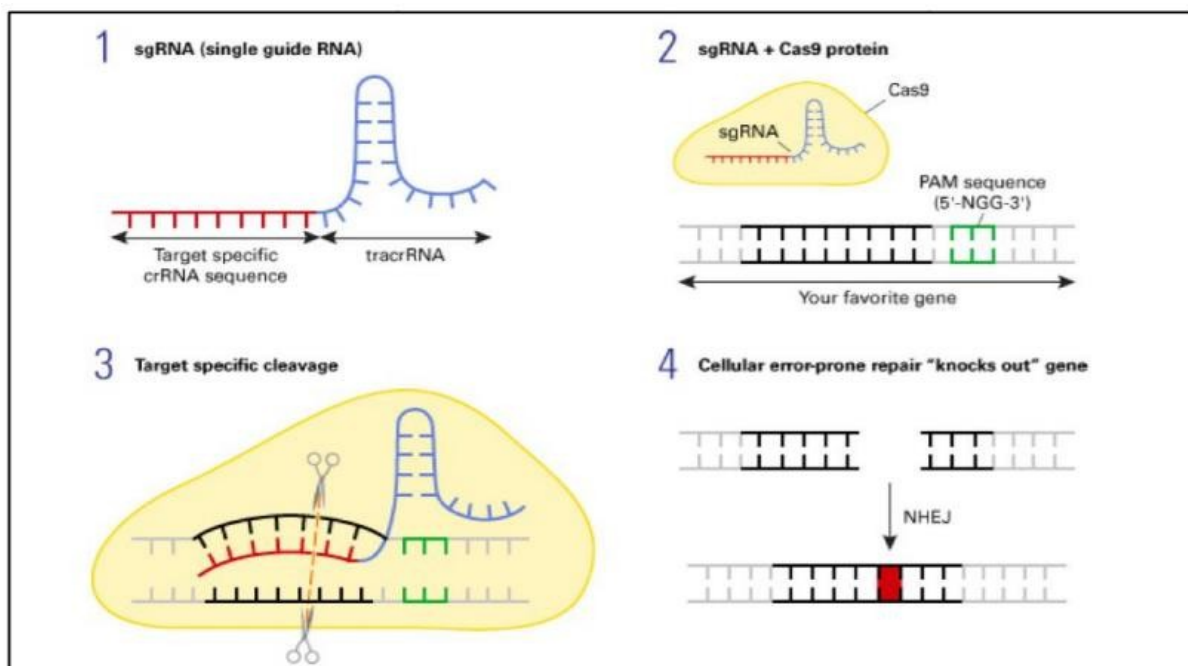
ZFNs merupakan protein yang mempunyai penempelan spesifik sekuens DNA (3 bp). ZFNs dapat mengedit gen spesifik (20 bp DNA) dari sebuah genom dengan penggabungan 6–8 *zinc finger*. Protein sintetik ini difusikan dengan domain katalitik endonuklease FokI utk menginduksi pemotongan DNA target dan reparasi DNA.

Sementara itu, TALENs adalah enzim restriksi artifisial yang digabungkan dengan domain katalitik endonuklease FokI dengan monomer yang sesuai dari domain penempelan DNA yang dapat diarahkan pada sekuens nukleotida tertentu pada genom. Setelah berada di inti sel, nuklease artifisial akan menempel pada situs target, domain FokI akan mengalami dimerisasi dan menyebabkan pemotongan DNA utas ganda pada sekuens target.

Para peneliti berusaha untuk menciptakan modul terbaru *genome editing* dan memiliki presisi tinggi. Belum lama ini, teknologi tersebut sudah ditemukan dan diberi nama *Cluster Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated protein-9 nuclease* (CRISPR- Cas 9). Modul teknologi *genome editing* ini disebut-disebut sebagai era penemuan baru dan terbesar dalam dunia biologi molekuler.

***Cluster Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated protein-9 nuclease* (CRISPR-Cas 9)**

Salah satu metode *genome editing*, yaitu *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9* (CRISPR/Cas9), menjadi populer karena lebih mudah penerapannya (Belhaj *et al.* 2013). Di beberapa negara, tidak adanya sisipan gen asing dalam produk CRISPR/Cas9 membuatnya dianggap bukan termasuk golongan PRG sehingga regulasi pelepasannya lebih mudah (Jones 2015; Bogdanove *et al.* 2018). Saat ini, beberapa produk CRISPR/Cas9 sudah dirakit di luar negeri dan sebentar lagi akan memasuki pasar dunia. Di Indonesia usaha perakitannya juga telah dimulai beberapa tahun lalu, namun masih pada fase awal (Santoso 2015).



Gambar 14.1. Prinsip kerja *Genome Editing* metode CRISPR-Cas9 (Podevin *et al.* 2013).

Prinsip kerja dari CRISPR-Cas9 untuk pengeditan gen :

- 1) sgRNA yang terdiri dari sekuen crRNA yang spesifik menasar DNA target dan tracrRNA yang berinteraksi dengan Cas9 protein.
- 2) Terbentuk ikatan kompleks antara sgRNA dengan pro mengandung aktivitas DNA endonuclease.
- 3) Ikatan kompleks tersebut akan menyebabkan dsDNA target terputus.
- 4) Situs yang terputus tersebut akan diperbaiki oleh lewat jalur – *non homologous end joining* (NHEJ), proses ini bisa menyebabkan insersi atau penghapusan dari nukleotida yang menyebabkan rusaknya fungsi gen(Ledford, 2016).

Ada dua komponen utama dalam sistem CRISPR-Cas9 yaitu protein Cas dan *single guide* RNA (sgRNA). Dalam sistem CRISPR-Cas tipe II, Cas 9 ini merupakan protein penting yang menjadi karakteristik utama dan sistem ini yang paling banyak digunakan dalam penelitian. Hal ini karena CRISPR-Cas tipe II ini memiliki komponen yang lebih sederhana yaitu 3 komponen (Cas9, crRNA dan trRNA) yang lebih mudah diadaptasi dibandingkan CRISPR-Cas tipe I, III dan IV. Cas 9 berfungsi sebagai enzim yang memotong DNA target di sekuen yang posisinya dekat dengan situs protospacer adjacent motif (PAM). Sekuen di situs PAM ini biasanya ditandai dengan 3 basa nukleotida (NGG, dengan N adalah basa nukleotida yang bisa berupa A: Adenin; T: Timin; C: Cytocine; G: Guanin). Protein cas9 ini memiliki 2 situs homolog yaitu RuvC dan HNH, yang masing-masing memotong satu dari untai ganda DNA, yang menghasilkan potongan tumpul (blunt cut) pada sekuen DNA target (Sprink *et al.*, 2015).

Selanjutnya, sgRNA yang merupakan RNA buatan gabungan dari dua noncoding RNA yaitu crRNA yang berfungsi sebagai guide yang bisa menyesuaikan dengan sekuen dari DNA target dan tracrRNA yang berfungsi sebagai *scaffold*. Sekuen sgRNA ini digunakan untuk mentarget lokus genom tanaman/hewan yang secara rata-rata panjangnya 19-22bp, dengan penambahan 3 bp sekuen PAM (NGG). Cas9 dan sgRNA dapat dikonstruksi dalam satu vektor atau bisa menggunakan dua vektor yang terpisah dengan mengkombinasikan dengan jenis promotor dan sekuen dari enzim restriksi lainnya tergantung dari karakter genom yang ditargetkan.

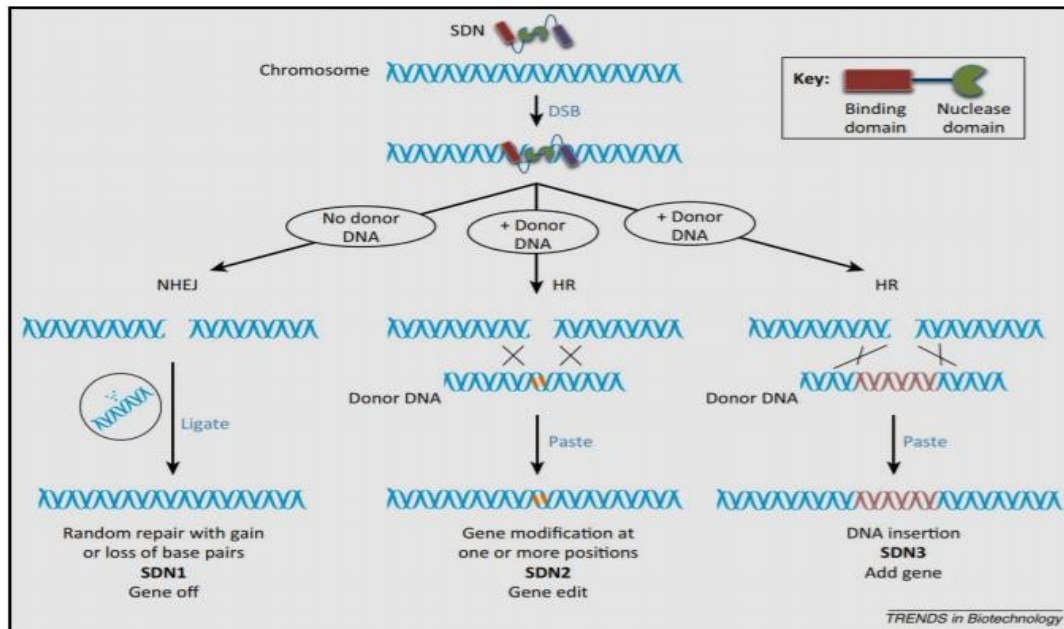
Metode pengeditan dari CRISPR ini, sama dengan dua teknologi sebelumnya yaitu adanya mekanisme reparasi akibat terpotongnya sekuen DNA target. Mekanisme reparasi tersebut bisa terjadi secara alami yang bergabung dengan *Non-Homologous End Joining* (NHEJ) maupun dengan menggunakan cetakan eksternal yang diinginkan seperti *Homology Repair* (HR). Dari mekanisme perbaikan ini maka akan terjadi insersi basa atau penghapusan nukleotida baru yang menyebabkan terjadinya disfungsi gen (Sprink *et al.*, 2015).

Jalur Reparasi

Hasil akhir pengeditan genom dipengaruhi oleh jalur reparasi (*repair pathway*) yang digunakan dan ketersediaan cetakan untuk reparasi. Dua jalur reparasi DSB yang telah diketahui, yaitu *nonhomologous end joining* (NHEJ) dan *homologous recombination* (HR) (Voytas 2013; Bortesi dan Fischer 2015).

Dalam mekanisme NHEJ, proses penyambungan kembali kedua utas DNA yang terpotong dapat menyebabkan terjadinya penyisipan atau penghilangan sekuen DNA secara acak. Hal ini dikarenakan sel tidak memiliki rujukan sekuen DNA yang harus dipulihkan atau mendapatkan rujukan yang keliru karena utas DNA masing-masing menempel pada posisi yang salah. Bila mekanisme NHEJ terjadi pada daerah pengode sebuah gen, dapat dihasilkan mutasi yang berakibat pada rusaknya atau hilangnya fungsi produk gen (protein) tersebut dan dikenal dengan istilah gene knockout (Puchta dan Fauser 2013).

Pada mekanisme HR, sebuah cetakan DNA digunakan sebagai rujukan sekuen DNA yang harus disalin oleh sel saat memperbaiki dan memulihkan kromosom yang digunting. HR dapat digunakan untuk memperoleh modifikasi sekuen DNA terarah dengan mengintroduksi ke sel sebuah SDN untuk menggunting daerah target dan sebuah cetakan yang memiliki sekuen yang mirip dengan daerah yang digunting tersebut. Melalui HR, penambahan (knock-in) gen utuh secara terarah juga dapat dilakukan dengan menggunakan cetakan DNA berisikan satu atau lebih gen yang diapit oleh sekuen homolog daerah target (Puchta dan Fauser 2013). Jalur reparasi DSB inilah yang digunakan para pembuat kebijakan untuk mengategorikan produk *genome editing* menjadi tiga tipe, yaitu SDN-1, SDN-2, dan SDN-3 (Lusser *et al.* 2011).



Gambar 14.2. Tiga tipe *Genome Editing* yang dibedakan berdasarkan mekanisme reparasi DSB untuk tujuan perumusan regulasi

Pada SDN-1, DSB direparasi dengan mekanisme NHEJ yang sering menghasilkan kesalahan kecil yang bersifat acak karena tidak ada cetakan DNA yang diberikan pada sel tanaman. Mekanisme ini paling mirip dengan mutasi alami yang sering ditemukan dalam pemuliaan berbasis mutasi (Podevin *et al.* 2013).

Pada SDN-2, mekanisme reparasi DSB yang digunakan ialah HR, cetakan DNA ditambahkan sebagai rujukan bagi sel sehingga perbaikan menghasilkan perubahan DNA berupa substitusi, penambahan, atau penghilangan sedikit basa DNA (Podevin *et al.* 2013). Mutasi semacam ini juga sulit dibedakan dengan mutasi alami, namun jelas bahwa dalam proses pembentukannya sangat diarahkan oleh manusia.

Pada SDN-3, DSB direparasi dengan cara yang sama seperti SDN-2, tetapi cetakannya berisikan sekuen yang lebih panjang, bahkan dapat berupa gen atau promotor utuh. Jadi, hasil akhir SDN-3 serupa dengan transformasi genetik, tetapi lokasi penyisipannya sangat presisi karena ditargetkan pada daerah spesifik pada genom atau menggantikan sekuen yang ada pada daerah target, misalnya untuk keperluan pertukaran promotor (van de Wiel *et al.* 2017).

Regulasi Produk *Genome Editing* di Indonesia

Dalam proses penyusunan regulasi untuk *genome editing*, regulasi PRG sangat relevan untuk dipertimbangkan mengingat sebagian metode *genome editing* juga menggunakan teknik rekayasa genetik dalam proses perakitannya. Secara umum, negara-negara di dunia mengatur PRG berdasarkan sifat produk atau proses perakitan produk tersebut (Sprink *et al.* 2016).

Regulasi berbasis proses seperti Protokol Cartagena mengatur secara khusus produk yang dirakit melalui proses tertentu, sedangkan regulasi berdasarkan produk tidak akan melihat metode perakitan, tetapi lebih fokus pada sifat produk yang dihasilkan. Aturan khusus yang diterapkan berupa kajian keamanan hayati, baik dalam aspek kesehatan manusia maupun lingkungan.

Indonesia sebagai salah satu negara yang meratifikasi Protokol Cartagena pada tahun 2004 mendasarkan regulasi PRG pada proses atau metode perakitan yang digunakan. Hal ini jelas tertera dalam PP No. 21 Tahun 2005 tentang Pedoman Pengkajian Keamanan Hayati PRG. Indonesia telah menerbitkan beberapa regulasi terkait pemanfaatan PRG ini, antara lain UU No. 16 Tahun 1996 tentang Pangan yang kemudian direvisi dengan UU No. 18 Tahun 2012 yang menyatakan bahwa sebelum diedarkan semua PRG harus terlebih dahulu lolos uji keamanan hayati.

Aplikasi *Genome Editing* Pada Bakteri Asam Laktat

Pada tahun 2007, para peneliti dari Danisco, yang bergerak dalam industri komposisi makanan yang dimiliki oleh DuPont, melakukan penelitian mengenai bakteri *Streptococcus thermophilus* yang sangat penting dalam industri pembuatan yoghurt dan keju. Bakteri ini ternyata menjadi bersifat lemah karena adanya cara bagaimana mendorong agar bakteri ini melawan serangan dari virus (fag) tersebut.

Mirip dengan prinsip vaksinasi, jadi bakteri tersebut diekspose dengan virus tersebut agar melawan serangan virus. Menariknya bakteri tersebut mampu menciptakan kekebalan imun sistem yang memungkinkannya untuk resisten pada serangan virus yang kedua dan seterusnya. Sistem pertahanan yang ditunjukkan oleh bakteri *S. thermophilus* tersebut menjadi sangat penting tidak hanya bagi para ahli makanan dan mikrobiologi tapi para ahli biologi molekuler lainnya untuk meneliti lebih lanjut (Pennisi, 2013).

Akhirnya, Danisco dan tim berhasil merubah *S. thermophilus* yang resisten terhadap serangan fag dengan menambah atau menghapus spacer DNA yang bersesuaian dengan fag. Pada saat itu para ahli tersebut masih belum memikirkan bahwa teknologi tersebut adalah cara kerja CRISPR dan potensi CRISPR sebagai teknologi genom editing dalam skala yang lebih besar (Pennisi, 2013).

Kemudian ahli dari Jerman, Doudna dan Emmanuelle Charpentier (2007) meneliti lebih jauh dari sistem CRISPR ini dengan mengaitkannya dengan protein protein lain untuk mengetahui bagaimana *S.thermophilus* ini menggunakan DNA *spacers* dalam sistem pertahanan imun mereka. Kedua ahli ini fokus menggunakan sistem CRISPR ini dengan protein yang disebut Cas9 untuk menyederhanakan sistem CRISPR dibandingkan dengan yang lain (Pennisi, 2013).

Bakteri Asam Laktat untuk fermentasi

Tren terbaru dalam menggunakan BAL untuk makanan terkait dengan memperbaiki sifat-sifat seperti nutrisi (misal produksi vitamin), kualitas organoleptik (misal pembentukan rasa) atau fungsi teknis (misal pembentukan polisakarida). Bakteri asam laktat juga merupakan kunci dalam proses fermentasi bahan dasar seperti biji kakao dan biji kopi (De Vuyst dan Weckx 2016; Pereira, Soccol dan Soccol 2016) yang selanjutnya berpengaruh signifikan pada kualitas produk akhir.

Fag *S.thermophilus* diklasifikasikan menjadi dua kelompok bernama cos dan pac sesuai dengan mekanisme pengemasan DNA mereka (Marrec et al., 1997). DT1, Sfi19, Sfi21 dan 7201 termasuk tipe-cos, sedangkan O1205, Sfi11, dan 2972 adalah fag tipe-pac (Lévesque et al., 2005). Mereka semua adalah bakteriofag umum dengan urutan genom lengkap dan homologi tinggi, yang akan meningkatkan kemampuan anti-fag sistem CRISPR / Cas.

Sistem CRISPR-Cas membangun 'dinding yang tidak bisa dihancurkan' pada bakteri, berfungsi melalui interferensi dan pemotongan gen eksogen (Choi dan Lee, 2016). Ketika terpapar fag, strain inang mengintegrasikan urutan pendek dari penyerbuan fag sebagai

spacer. Selain itu, penambahan *spacer* baru hanya terdeteksi di CRISPR1 dan CRISPR3 (Paezespino *et al.*, 2015). Dan baik CRISPR2 maupun CRISPR4 tidak memperoleh urutan DR baru apa pun meskipun CRISPR4 / Cas menyajikan aktivitas biokimia *in vitro* (Sinkunas *et al.*, 2013). Setelah transkripsi lokus CRISPR yang mengandung urutan DR ditambahkan dan pemrosesan lebih lanjut, CRRNA untai tunggal dengan struktur kedua bergabung dengan kompleks Cas atau Cascade untuk membentuk efek CRISPR *nucleoprotein complex* (CRRNP). Fungsi CRRNP sebagai endonuklease dipandu oleh CRRNA. Akhirnya, inang kebal terhadap fag yang menyerang kembali melalui pembelahan urutan spesifik dari DNA fag.

Bakteri Asam Laktat untuk Probiotik

Lactobacillus adalah genus yang luar biasa dan beragam yang mengandung lebih dari 200 spesies berbeda dan merupakan genus terbesar dalam bakteri asam laktat. *Lactobacilli* ditemukan di berbagai lingkungan, termasuk tanaman dan hewan, dan beberapa spesies umumnya ditemukan di saluran GI mamalia. Banyak strain dapat menahan kondisi keras yang dijumpai selama transit GI, mis., Asam lambung dan asam empedu, yang membuat galur *lactobacilli* terpilih yang tidak terdomestikasi memilih kendaraan pengiriman.

Salah satu pendekatan untuk meningkatkan sifat probiotik adalah memodifikasi gen asli yang berkontribusi pada imunomodulasi. Meskipun pemahaman mekanistik keseluruhan fitur probiotik sebagian besar masih kurang, permukaan sel luar bakteri memainkan peran kunci dalam interaksi probiotik-host. Permukaan sel luar bakteri Gram-positif terdiri dari lapisan peptidoglikan tebal yang mengandung polimer gugus fosfat-alditol selain protein dan polisakarida. Polimer dari gugus fosfat-alditol juga dikenal sebagai asam teikoat (TA). TA dapat dikaitkan dengan peptidoglikan (TA sel dinding) atau ke membran melalui glikolipid (asam lipoteikoat [LTA]). Kehadiran TA tampaknya dilestarikan dalam *lactobacilli*, meskipun beberapa spesies, termasuk *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, dan *L. reuteri*, tidak menghasilkan TA dinding sel. Peran menjanjikan dalam imunomodulasi menawarkan target potensial untuk meningkatkan efisiensi probiotik (Choi dan Lee, 2016).

Sebagai contoh, TA bertindak pada reseptor seperti mamalia yang merangsang sel-sel dendritik dan selanjutnya mengarah pada respon sitokin. Juga, TA dapat memengaruhi adhesi bakteri ke sel inang. Dengan demikian, perubahan komponen dinding sel tersebut dengan pendekatan rekayasa genome dapat lebih meningkatkan profil probiotik dari suatu strain. Sedangkan LTA yang dimurnikan dari *L. plantarum* WCFS1 memunculkan respon proinflamasi, integrasi vektor KO 'bunuh diri' pada gen yang bertanggung jawab untuk D-*alanylation* dari TA mengubah profil imunomodulator menjadi anti-inflamasi. Selain itu, strain yang dimodifikasi secara genetik memberikan peningkatan perlindungan dalam model *murine colitis*. Karya elegan ini dan karya orang lain tidak hanya menjelaskan imunomodulasi yang dimediasi *Lactobacillus*, tetapi juga memberikan kesempatan yang menarik untuk menjelajahi jalur ini untuk meningkatkan fitur probiotik (Choi dan Lee, 2016).

DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah, N.A., Prakash, C.S. & McHughen, A.G. (2015) Genome editing for crop improvement: Challenges and opportunities. *GM Crops & Food*. [Online] 6 (4), 183– 205. Available from: [doi:10.1080/21645698.2015.1129937](https://doi.org/10.1080/21645698.2015.1129937) [Accessed 30 August 2019].
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., et al. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315 1709–1712. [10.1126/science.1138140](https://doi.org/10.1126/science.1138140)
- Beetham, P.R., Kipp, P.B., Sawycky, X.L., Arntzen, C.J. & May, G.D. (1999) A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V. (2013): Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* 9, 39.
- Bortesi, L. & Fischer, R. (2015) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*. [Online] 33 (1), 41–52. Available from: [doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2014.12.006](https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2014.12.006) [Accessed 13 May 2019].
- Choi K. R., Lee S. Y. (2016). CRISPR technologies for bacterial systems: current achievements and future directions. *Biotechnol. Adv.* 34 1180–1209. [10.1016/j.biotechadv.2016.08.002](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.002)
- De Vuyst L, Weckx S. The cocoa bean fermentation process: From ecosystem analysis to starter culture development. *J Appl Microbiol* 2016; **121**:5–17.
- Ledford, H. (2016): Riding the CRISPR Wave. *Nature*, 531(7593), 156-159.
- Lévesque C., Duplessis M., Labonté J., Labrie S., Fremaux C., Tremblay D., et al. (2005). Genomic organization and molecular analysis of virulent bacteriophage 2972 infecting an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 4057–4068. [10.1128/AEM.71.7.4057-4068.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4057-4068.2005)
- Lusser, M., Parisi, C., Rodriguez Cerezo, E. & Plan, D. (2011) New plant breeding techniques: state-of-the-art and prospects for commercial development. [Online] Publications Office of the European Union. EUR Scientific and Technical Research Reports. Available from: [doi:10.2791/54761](https://doi.org/10.2791/54761) [Accessed 30 August 2019].
- Marrec C. L., Sinderen D. V., Walsh L., Stanley E., Vlegels E., Moineau S., et al. (1997). Two groups of bacteriophages infecting *Streptococcus thermophilus* can be distinguished on the basis of mode of packaging and genetic determinants for major structural proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 3246–3253.
- Podevin, N., Davies, H.V., Hartung, F., Nogué, F. & Casacuberta, J.M. (2013) Site-directed nucleases: A paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. *Trends in Biotechnology*. [Online] 31 (6), 375–383. Available from: [doi:10.1016/j.tibtech.2013.03.004](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.004) [Accessed 4 April 2019].
- Santoso, T.J. (2015) CRISPR, teknologi pengeditan genom terarah untuk pengembangan tanaman nontransgenik. *Warta Biogen*, 11 (2), 9–12.
- Schinkel H & Schillberg S. (2016): Genome editing: intellectual property and product development in plant biotechnology. *Plant cell reports*, 1-5.
- Sinkunas T., Gasiunas G., Waghmare S. P., Dickman M. J., Barrangou R., Horvath P., et al. (2013). *In vitro* reconstitution of Cascade-mediated CRISPR immunity in *Streptococcus thermophilus*. *EMBO J.* 32 385–394. [10.1038/emboj.2012.352](https://doi.org/10.1038/emboj.2012.352)

- Sprink T, Metje J, Hartung F. (2015): Plant genome editing by novel tools: TALEN and other sequence specific nucleases. *Current Opinion in Biotechnology* 32, 47-53.
- Pennisi, E. (2013): The CRISPR craze. *Science*, 341(6148), 833-836.
- Puchta, H. & Fauser, F. (2013) Gene targeting in plants: 25 years later. *The International Journal of Developmental Biology*. [Online] 57 (6-7-8), 629–637. Available from: [doi:10.1387/ijdb.130194hp](https://doi.org/10.1387/ijdb.130194hp) [Accessed 13 May 2019].
- van de Wiel, C.C.M., Schaart, J.G., Lotz, L.A.P. & Smulders, M.J.M. (2017) New traits in crops produced by genome editing techniques based on deletions. *Plant Biotechnology Reports*. [Online] 11 (1), 1–8. Available from: [doi:10.1007/s11816-017-0425-z](https://doi.org/10.1007/s11816-017-0425-z) [Accessed 13 May 2019].
- Voytas, D.F. (2013) Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annual Review of Plant Biology*. [Online] 64 (1), 327–350. Available from: [doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105552](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105552) [Accessed 13 May 2019]

TOPIK 15
KEAMANAN BAKTERI ASAM LAKTAT HASIL REKAYASA GENETIKA
(Inas Khoirunnisa - 15/385572/TP/11441)

Bakteri asam laktat (BAL) telah dimanfaatkan oleh manusia dalam kurun waktu yang lama. Beberapa BAL dapat ditemukan secara alamiah ditubuh manusia dan memiliki manfaat kesehatan untuk manusia. Akibat pemanfaatannya sejak lama dan perkembangan dibidang bioteknologi yang cukup pesat mengarahkan adanya pengembangan cara untuk melakukan rekayasa genetik pada bakteri asam laktat.

Proses rekayasa genetik mampu mengubah susunan genetika dari suatu mikroorganisme yang nantinya akan mempengaruhi proses transkripsi dan translasi. Akibat perubahan transkripsi dan translasi, proses metabolisme sel akan ikut berubah. Proses rekayasa genetik dapat dilakukan dengan menghapus atau memutasi gen yang dikehendaki.

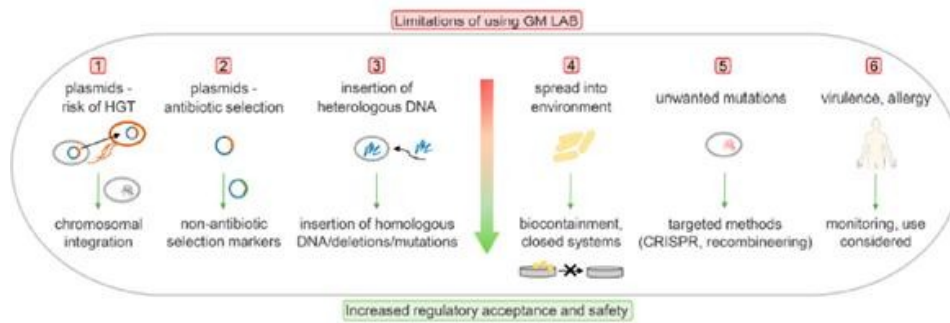
Proses rekayasa genetik pada BAL mampu meningkatkan beberapa kemampuan bakteri asam laktat seperti viabilitas sel, stabilitas sel, produksi dan kecepatan tumbuh sel, sehingga menghasilkan strain BAL dengan kemampuan lebih baik serta memungkinkan pemanfaatannya yang lebih luas, antara lain untuk bidang medis (contoh: vaksin), industri pangan dan produksi metabolit kimia (Plavec dan Berlec, 2020).

Namun modifikasi genetika ini memiliki beberapa kekurangan untuk diterapkan di industri karena beberapa alasan, antara lain kurangnya penerimaan konsumen terhadap produk hasil rekayasa genetika dan susah dalam perizinannya. Oleh karenanya industri menghindari penggunaan bakteri asam laktat hasil rekayasa genetika dan lebih memilih menggunakan BAL hasil *strain improvement* (Johansen, 2017).

Adapun metode rekayasa genetik yang diizinkan di Uni Eropa antara lain perubahan alamiah, dan random mutagenesis. Sedangkan metode rekayasa genetik yang dilarang di Uni Eropa antara lain transformasi menggunakan plasmid dan integrasi genom; *recombineering*; CRISPR- Cas9 yang ditunjang dengan *genome rearrangement*, *recombineering*, dan integrasi gen Plavec dan Berlec, 2020).

Untuk mengatasi beberapa potensi masalah dan mencapai perizinan dapat dilakukan *risk assessment* dan pembatasan dalam proses rekayasa BAL. *Risk assessment* bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengevaluasi potensi dampak buruk dari GM-LAB (*genetic modified lactic acid bacteria*). Dampaknya dapat secara langsung atau tidak langsung, dalam kurun waktu dekat atau dimasa yang akan mendatang. *Risk assessment* melihat spesifik pada cara bagaimana produk rekayasa genetika dikembangkan dan memeriksa bahaya yang berhubungan dengan metabolit yang ada di produk (contohnya racun atau protein alergenik), serta potensi adanya transfer gen (contohnya transfer resisten antibiotik). Untuk melihat bahaya keseluruhan dari suatu BAL hasil rekayasa genetik, perlu dilakukan identifikasi berbagai karakteristik dari GM-LAB yang mungkin menimbulkan efek samping dan kemungkinan munculnya. Dari data tersebut, bahaya dapat diperkirakan dan bagaimana cara mencegah munculnya bahaya dapat di aplikasikan kedepannya (Sybesma et.al, 2006).

Berdasarkan gambar 15.1, ada beberapa batasan yang dapat diterapkan untuk meningkatkan keamanan dan meningkatkan tingkat perizinan penggunaannya.



Gambar 15.1. Batasan pengembangan Genetically Modified Lactic Acid Bacteria (GM-LAB). HGT: horizontal transfer gene; CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats (Plavec dan Berlec, 2020).

1. Biocontainment

Biocontainment adalah cara yang digunakan untuk mencegah penyebaran materi genetik dari strain bakteri yang direkayasa secara lateral baik ke bakteri lain maupun ke lingkungan. Sistem biocontainment dapat dilakukan secara aktif maupun pasif.

- a. *Active biocontainment system*, host akan dimatikan dengan cara mengaktifkan killing gene (gen pembunuh) atau melakukan represi pada gen yang penting, yang mana ekspresi gennya di control oleh elemen yang responsif terhadap lingkungan. Kekurangan dari sistem ini (i) sistem ini menghasilkan DNA asing dalam jumlah besar, (ii) banyak plasmid yang tertahan, (iii) mutasi yang terjadi dapat menginaktifkan killing gene atau menghasilkan ekspresi gen yang bersifat konstitutif pada essential gene. (kurang pasif containment)
- b. *Passive biocontainment system*, sistem ini lebih kuat dan lebih mudah dibanding sistem aktif. Sistem pasif didasarkan pada metode melengkapi suatu gen auxotrophy atau gen yang rusak dengan menambahkan gen utuh atau metabolit penting. Kekurangan sistem pasif adalah menghasilkan gen yang bersifat bacteriostatic daripada bactericidal (Lee, 2010).

Salah satu metode biocontainment terbaru menggunakan synthetic gene circuits untuk mengontrol proliferasi sel akibat responnya terhadap lingkungan yang dideteksi oleh faktor transkripsi yang diatur secara alosterik. Untuk membentuk auxotroph sintesis, strain yang bergantung pada suplai molekul sintesis kecil eksogen untuk ekspresi gen esensial dikonstruksi dalam *E. coli*. Sistem biocontainment ini memiliki perlindungan yang tumpang tindih: riboregulator yang direkayasa untuk mengendalikan ekspresi esensial gen; dan addiction module yang direkayasa pada nuclease yang membelah genom host berdasarkan nukleasi yang membelah genom inang. Ekspresi gen esensial tergantung pada ketersediaan molekul quorum-sensing acyl-homoserine lactone; ketersediaannya dalam jumlah banyak hanya dapat dicapai saat berada pada lingkungan dengan kepadatan sel tinggi. Bakteri ini bertahan hanya ketika mereka ada dikemas dalam kapsul khusus, karena densitasnya yang tinggi. Bakteri yang lolos dari kapsul akan mati terbunuh karena penurunan densitas lingkungannya. Strategi biocontainment baru ini bisa saja dipindahkan dari *E. coli* ke BAL (Plavec dan Berlec, 2020).

2. Penggunaan homologous DNA

Dari regulasi yang ada, penggunaan DNA dari homologous host (contoh: cisgenic DNA) atau dari organisme yang telah memiliki sertifikat GRAS lebih dipilih untuk proses genetic engineering. Penggunaan DNA dari spesies lain atau DNA dari heterologous host dikhawatirkan mampu menimbulkan transgenic organism yang dilarang oleh pihak terkait dalam penggunaannya dibidang pangan.

Untuk memperoleh strain dengan sifat yang dikehendaki, dapat didapat dengan mengubah susunan DNA dari strain tersebut. Susunan DNA yang tidak dikehendaki akan dipotong atau digantikan oleh DNA dari strain atau spesies lain. Status dari strain cisgenik dan strain yang gennya dihapus atau diganti pasangan basa tunggalnya tergantung pada metode modifikasi gennya. Di Uni Eropa, proses alamiah (mutasi alami) dilabeli non-GMO, sedangkan yang menggunakan CRISPR dan metode rekombinasi lainnya dilabeli GMO (Plavec dan Berlec, 2020).

3. Antibiotic free selection system

Untuk mengatasi kendala regulasi, untuk mengembangkan *marker-less expression hosts* atau untuk memproduksi vector yang aman, kita dapat mengaplikasikan antibiotic-free selection systems (sistem seleksi bebas antibiotik) dan mekanisme penambahan plasmid telah dikembangkan beberapa tahun terakhir (Mignon et.al, 2015). Adapun metode yang digunakan antara lain (1) penambahan auxotrophic marker, (2) post-segregational killing (PSK), (3) RNA-interference, (4) proses *de-repression* dari sebuah gen penting (essential gene), (5) integrasi kromosomal, (6) minicircles dan (7) ketahanan non- antibiotik.

4. Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and its Use in the Selection of Genetically Modified Organisms

Bakteri asam laktat mampu menjadi salah satu penyimpan gen resisten antibiotik. Transfer gen sendiri terjadi secara vertikal, jadi tidak membahayakan bakteri itu sendiri. Namun, beberapa faktor eksternal mampu menimbulkan transfer horizontal gen resisten antibiotik ke bakteri patogen melalui rantai makanan. Proses transfer horizontal ini dapat terjadi melalui proses transduksi atau proses transformasi antar mikroorganisme. Beberapa studi menunjukkan bahwa bakteri asam laktat mampu mengembangkan sifat resisten antibiotic (Plavec dan Berlec, 2020).

Untuk mengevaluasi antibiotic susceptibility (kerentanan antibiotic) suatu BAL dapat dilakukan dengan menggunakan deteksi genotip dan fenotip. Deteksi genotip dilakukan dengan polymerase chain reaction (PCR) untuk mengidentifikasi gen yang resisten terhadap antibiotik sedangkan deteksi fenotip dilakukan dengan pengukuran pertumbuhan BAL pada suatu media yang telah diberi antibiotik. Pada deteksi fenotipik, hasil pengukuran dinyatakan dalam satuan minimum inhibitory concentrations (MICs), untuk tiap antibiotik memiliki nilai MIC berbeda- beda. Hampir seluruh BAL diuji menggunakan standar dari ISO 10932: 2010 (Plavec dan Berlec, 2020). Untuk strain *Enterococcus* perlu dievaluasi menggunakan metode yang dijelaskan oleh Clinical and Laboratory Standards Institute. PCR-based techniques atau micro- arrays dapat digunakan sebagai tes pelengkap untuk mendapat hasil yang lebih akurat dan konsisten (Clementi dan Aquilanti, 2011). Bakteri asam laktat dapat dikategorikan aman apabila nilai MIC yang dimiliki nilai dibawah nilai cut off. Apabila diatas nilai cut off maka BAL tergolong resisten terhadap antibiotik, dan resistensinya harus dikonfirmasi lagi menggunakan metode molekuler seperti PCR (European food safety, 2008). Gen resisten antibiotik biasanya digunakan pada proses rekayasa genetika untuk menyeleksi dan

memelihara plasmid. Karena resiko dari gen resisten antibiotik cukup berbahaya maka disarankan untuk menggunakan seleksi lain yang lebih aman (contoh: antibiotic-free systems) (Plavec dan Berlec, 2020).

5. Virulensi dan potensi menimbulkan alergi

Gen yang telah mengalami modifikasi harus dievaluasi faktor virulensinya dan potensi alergi yang mungkin ditimbulkan. Beberapa faktor yang bisa dievaluasi antara lain gen yang mungkin dapat meningkatkan patogenitas sel. Gen tersebut mungkin mampu mengkode sintesa senyawa yang bersifat toksik. Oleh karenanya, protein baru yang dihasilkan dari metabolisme bakteri hasil rekayasa genetik perlu dicek susunan protein penyusunnya. Selain itu aktivitas anti-nutrien yang mungkin muncul (contohnya inhibitor protease) perlu dievaluasi menggunakan gastric and intestinal model system (Plavec dan Berlec, 2020).

6. Delayed adverse effect

Reaksi tubuh tiap individu akan berbeda-beda terhadap suatu produk bergantung pada cara pengaplikasian produk dan profil genetik individu tersebut. Oleh karena perlu dilakukan monitoring dalam jangka waktu tertentu pada konsumen setelah dilakukan perilsan makanan baru dipasaran. Konsumsi produk secara tidak konsisten mampu menjadi hambatan teknis dalam monitoring reaksi individu dalam jangka waktu lama. Pada non GM-LAB, proses monitoring dilakukan secara tertutup (close monitoring). Untuk GM-LAB, close monitoring juga disarankan untuk dilakukan. Proses monitoring ini dimaksudkan untuk mencegah efek samping yang muncul tertunda (delayed adverse effect) dan untuk menjamin keamanan konsumen (Plavec dan Berlec, 2020).

7. Surface display

Microbial surface display merupakan salah satu teknologi terbaru yang memiliki potensi aplikasi yang beragam dibidang bioteknologi. Microbial surface display dapat digunakan untuk screening pustaka peptide, mendeteksi adanya mutasi dan seleksi binder. BAL merupakan salah satu bakteri yang menarik untuk dilakukan surface display pada heterologous proteinnnya karena status GRAS mereka yang aman, aplikasinya luas di industri, dan menunjukkan beberapa manfaat kesehatan sebagai probiotik. Surface-engineered BAL dapat digunakan untuk industri pangan dan medis, selain itu Surface-engineered BAL merupakan salah satu alternatif non- GMO (Zadravec et.al, 2015).

Modifikasi genetik pada bakteri untuk *surface display* dapat dihindari dengan penambatan non-kovalen dari protein heterolog rekombinan pada permukaan non-GMO BAL atau pada *non-viable bacteria-like particles* (BLPs). Apabila protein rekombinan yang diproduksi di host berbeda dengan yang ditampilkan, maka metodenya disebut *heterologous surface display*. Metode ini tidak melibatkan modifikasi genetic, hanya melibatkan protein rekombinan. Agar proses surface display berhasil, rekombinan protein harus mampu menempel pada dinding sel, baik dengan ikatan kovalen maupun non-kovalen. Pada pengikatan kovalen diperlukan enzim atau penambahan cross-linking reagent. Sedangkan pengikatan non-kovalen tidak memerlukan penambahan zat apapun sehingga lebih dipilih untuk digunakan (Zadravec et.al, 2015). Beberapa heterologous protein surface display berhasil digunakan untuk BAL. misalnya endolysin Lyb5 yang digabungkan dengan GFP dan diekpresikan di E.coli selanjutnya di tempelkan ke beberapa BAL antara lain *L. lactis*, *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, dan *S. thermophilus* (Hu et.al, 2010)

DAFTAR PUSTAKA

- Clementi, F., Aquilanti, L. 2011. *Recent Investigations and Updated Criteria for The Assessment of Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria*. *Anaerobe* .17. 394–398.
- European Food Safety, A. 2008. *Technical Guidance - Update of The Criteria Used in The Assessment of Bacterial Resistance to Antibiotics of Human or Veterinary Importance*. *EFSA J.* 6. 732.
- Hu, S., Kong, J., Kong, W., Guo, T., Ji, M. 2010. *Characterization Of A Novel Lysm Domain from Lactobacillus Fermentum Bacteriophage Endolysin and Its Use as An Anchor to Display Heterologous Proteins On The Surfaces of Lactic Acid Bacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2410–2418.
- Johansen, E. 2017. *Future access and improvement of industrial lactic acid bacteria cultures. Microbial Cell Factories*. *Microb. Cell Fact.* 16. 230.
- Lee, P. 2010. *Biocontainment Strategies For Live Lactic Acid Bacteria Vaccine Vectors*. *Bioengineered Bugs*, 1:1, 75-77.
- Mignon, C., Sodoyer, R., & Werle, B. 2015. *Antibiotic-Free Selection in Biotherapeutics: Now and Forever*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 4:2. 157–181.
- Plavec, T. V. dan Berlec, A. 2020. *Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria*. *Microorganisms*. 8:297
- Renault, P. 2002. *Genetically Modified Lactic Acid Bacteria: Applications To Food or Health and Risk Assessment*. *Biochimie*. 84:11. 1073-1087.
- Sybesma, W., Hugenholtz, J., De Vos, W. M, Smid, E. J. 2006. *Safe Use of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria in Food: Bridging the Gap Between Consumers, Green Groups, and Industry*. *Electron. J. Biotechnol.* 9:4. 425-448.
- Zadravec, P.; Štrukelj, B.; Berlec, A. 2015. *Heterologous surface display on lactic acid bacteria: Non-GMO alternative?*. *Bioengineered*. 6. 179–183.

TOPIK 16
TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN PADA BAKTERI ASAM LAKTAT
DI BIDANG PANGAN

(Misael Chandra - 15/385585/TP/11454)

Bakteri asam laktat (BAL) adalah salah satu mikroorganisme yang mempunyai peranan penting dalam ilmu pangan. Bakteri asam laktat memiliki status *Generally Recognized as Safe* (GRAS), bahkan beberapa spesies diketahui memberi manfaat terhadap kesehatan. (Plavec dan Berlec, 2020). Produk pangan yang menggunakan BAL telah banyak dijumpai, khususnya pada makanan fermentasi dan probiotik. Hingga saat ini, berbagai penelitian terus dilakukan untuk mempelajari bahkan meningkatkan potensi serta manfaat dari BAL.

Dalam ilmu bioteknologi, rekayasa genetika pada BAL dapat diterapkan dengan tujuan meningkatkan kualitas strain, kestabilan, produksi, dan laju pertumbuhannya (Plavec dan Berlec, 2020). Teknologi DNA rekombinan merupakan salah satu teknik rekayasa genetika yang banyak dipelajari. Dibanding mutagenesis, DNA rekombinan memiliki keunggulan karena mampu menargetkan secara akurat dan presisi sifat baru yang ingin diekspresikan dari produk yang akan dimodifikasi (Derckx *et al.*, 2014). Akan tetapi, adanya aturan yang ketat dari pemerintah serta penerimaan konsumen yang rendah menjadi kendala bagi strain BAL hasil rekayasa genetika pada produk pangan dipasarkan (Johansen, 2018). Hal ini dikarenakan potensi risiko apabila terjadi transfer gen resisten antibiotik dari kultur hasil rekombinasi DNA yang dikonsumsi ke bakteri patogen di usus manusia (Álvarez-Cisneros dan Ponce-Alquicira, 2018). Oleh karena itu, belum ada strain BAL hasil rekayasa genetika yang telah memperoleh persetujuan FDA (*Food and Drug Administration*) maupun telah diperdagangkan secara komersial (Plavec dan Berlec, 2020). Meskipun demikian, kajian terhadap produk rekayasa genetika BAL terus berkembang. Diketahui faktor utama penyebab keamanan produk diragukan berasal dari pemakaian marker gen resisten antibiotik. Oleh sebab itu, para peneliti mulai mengembangkan vektor yang bersifat *food-grade*, sehingga aman apabila diaplikasikan pada produk pangan. Penggunaan marker dengan sifat resisten antibiotik perlu diganti dengan marker alternatif yang lebih aman (Trombert, 2015).

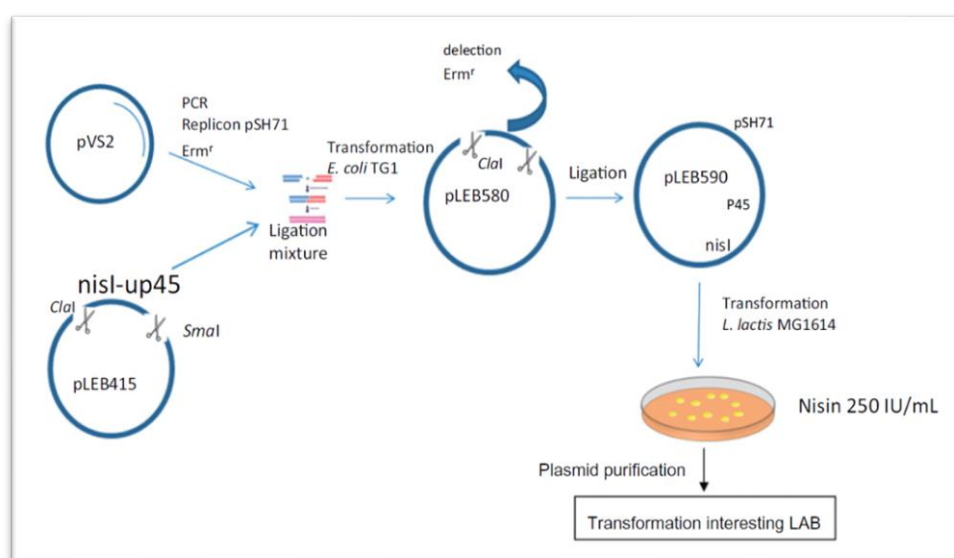
Suatu organisme yang telah mengalami manipulasi gen pada hakikatnya tergolong sebagai rekayasa genetika. Akan tetapi, apabila modifikasi tersebut dilakukan menggunakan DNA organisme itu sendiri atau organisme lain yang berstatus GRAS, maka tidak serta merta akan dinyatakan sebagai produk *non-food grade* (Lu *et al.*, 2013). Contohnya pada *self-cloning*, teknik DNA rekombinan yang menggunakan host dengan strain satu spesies yang memiliki keterkaitan dan bersifat GRAS, tidak tergolong sebagai produk rekayasa genetika sehingga bisa diaplikasikan pada produk pangan. (De Vos dan Simons, 1994). Dengan demikian, pemakaian vektor yang *food-grade* dalam menerapkan teknologi DNA rekombinan akan membuka peluang bagi produk rekayasa genetika memperoleh status GRAS.

Status GRAS untuk produk pangan BAL rekombinan sebenarnya tetap memungkinkan untuk diperoleh walau tanpa vektor *food-grade*. Hal ini dicapai dengan syarat metabolit yang dihasilkan harus dipisahkan dari mikroorganisme produsen metabolit tersebut (Landete, 2017). Bakteri hasil rekombinan ini berperan sebagai *cell factories*, di mana proses metabolisme bakteri dimanipulasi untuk meningkatkan produksi senyawa yang dikehendaki, atau menekan produksi senyawa selain target. Proses ini dilakukan pada sistem tertutup untuk mencegah terjadinya kontak antara bakteri dan lingkungan sehingga meminimalisir risiko kontaminasi. Dari sisi peraturan, karena mikroorganisme tidak ikut dikonsumsi, maka batasan yang berlaku juga lebih longgar (Plavec dan Berlec, 2020).

Produk utama fermentasi BAL yaitu senyawa asam laktat, yang dapat dimanfaatkan sebagai agen perisa, pengatur keasaman, dan sebagai inhibitor bakteri (Gao *et al.*, 2011). Abdullah *et al.*, 2010 menemukan bahwa chaperone DnaK *E. coli* yang diekspresikan dalam *L. lactis* NZ9000 memiliki ketahanan lebih baik dalam lingkungan bersuhu tinggi, juga pada konsentrasi garam, asam laktat, dan alkohol yang lebih pekat. Produksi asam laktat juga dilaporkan mengalami peningkatan. Menurut Ye *et al.* (2010), penyisipan gen alanine dehidrogenase (AlaDH) dari *Bacillus subtilis* ke dalam *L. lactis* NZ9000 berpotensi meningkatkan produksi alanin, yang merupakan salah satu pemanis alami dalam bahan pangan. Bongers *et al* (2005) melaporkan bahwa ekspresi gen PDC dan NoxE pada *L. lactis* menunjukkan adanya kenaikan produksi asetaldehid, salah satu senyawa aroma utama dalam yoghurt.

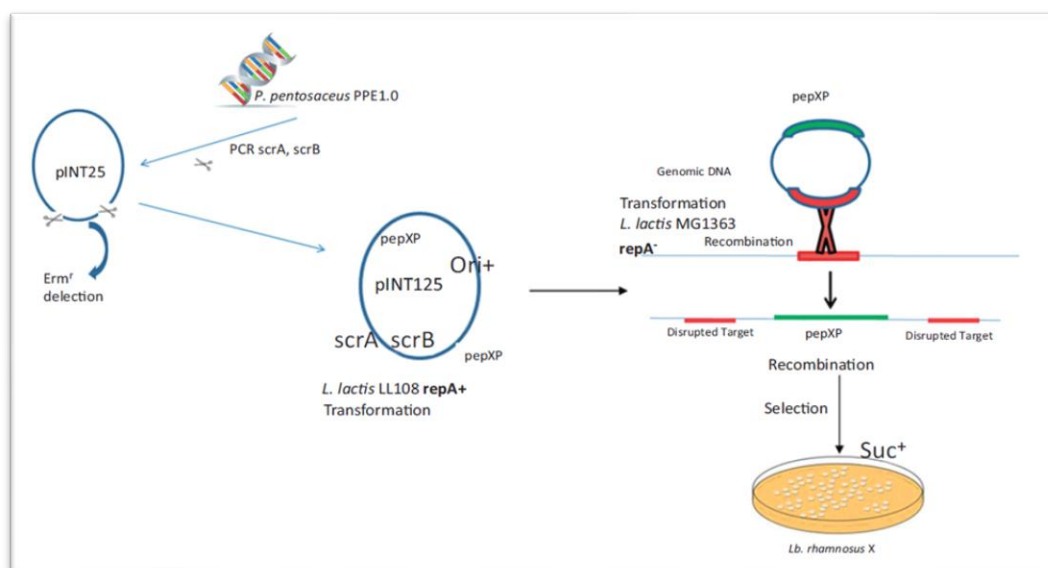
Produksi vitamin B2 (riboflavin) yang tinggi ditemukan pada *L. lactis* yang disisipi rib operon (*ribGBAH*), sementara ekspresi *folKE* pada *L. lactis* menunjukkan peningkatan produksi senyawa folat ekstraseluler hingga 8 kali lipat, sementara itu produksi total folat meningkat dua kali lipat (Sybesma *et al.*, 2003). Senyawa vitamin ini dapat dimanfaatkan sebagai komponen dalam suplemen pangan. Terakhir, ekspresi gen *hyaluronic acid synthase* dari *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* dalam *L. lactis* secara signifikan meningkatkan produk asam hialuronat. Asam hialuronat merupakan salah satu komponen yang dimanfaatkan dalam pengembangan produk makanan sehat (Chian dan Lee, 2007).

Ada dua metode kloning BAL yang dapat ditempuh menggunakan vektor *food-grade*, yaitu kloning berbasis plasmid replikatif dan integratif. Studi tentang kloning dengan basis plasmid replikatif dilakukan oleh Takala *et al.* (2003) menggunakan plasmid pLEB590 dengan marker resisten terhadap nisin (bakteriosin). Plasmid pLEB590 bersifat *food-grade* dan berasal dari strain *L. lactis* TML0. Gen marker erythromycin pada pLEB590 dihilangkan, lalu plasmid dibentuk dari DNA lactococci menggunakan replicon pSH71, gen *nisl*, dan promotor P45 untuk ekspresi gen. Plasmid kemudian disisipkan ke dalam *L. lactis* MG1614 dengan cara elektroporasi. Diperoleh hasil bahwa strain BAL rekombinan dapat tumbuh dalam media dengan kandungan nisin hingga 250 IU/mL. Penerapan plasmid replikatif pada kloning dapat dilihat pada Gambar 16.1. berikut.



Gambar 16.1. Contoh kloning vektor *food-grade* pada BAL berbasis plasmid replikatif

Adapun studi kloning dengan vektor *food-grade* berbasis plasmid integratif dikembangkan oleh (Leenhouts *et al.*, 1996). Plasmid pINT124 disusun menggunakan Ori+ dari pWV01, gen marker ekspresi sukrosa dari *Pediococcus pentosaceus* PPE1.0, sebuah *site* dengan kemampuan kloning ganda, dan fragmen DNA lactococci yang telah dikarakterisasi area kromosomalnya. Gen marker resisten terhadap erythromycin dihilangkan dari pINT25. Dalam sistem terdapat dua strain *L. lactis*, LL108 dan LL302 yang menghasilkan protein RepA yang berperan terhadap replikasi vektor Ori+. Strain ini membantu menyusun dan mengisolasi bentuk replikasi plasmid. Selanjutnya, dilakukan pemurnian dan penyisipan pINT125 ke dalam strain yang tidak memproduksi protein RepA sementara *L. Lactis* MG1363 akan menghasilkan integrasi *single-cross-over* plasmid dalam *L. lactis* MG1363 yang menyebabkan perbanyakan kromosom pada host dalam media yang hanya mengandung sumber gula sukrosa. Gambaran mengenai metode ini ditunjukkan pada Gambar 16.2. berikut.



Gambar 16.2. Contoh kloning vektor *food-grade* pada LAB berbasis plasmid integratif

Adapun beberapa marker lain yang tergolong sebagai plasmid *food-grade* ditunjukkan pada Tabel 16.1. Berikut

Tabel 16.1. Marker selektif food-grade beserta bakteri *carrier*-nya

Marker selektif	Donor	Host	Gen marker
<i>Penanda pemakaian gula</i>			
Fermentasi xilosa (D)	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>xyl/RAB</i>
Fermentasi inulin (D)	<i>B. subtilis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>levA</i>
Fermentasi sukrosa (D)	<i>P. pentosaceus</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>scrA/scrB</i>
Fermentasi laktosa (C)	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. helveticus</i>	<i>lacLM</i>
Fermentasi laktosa (C)	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>lacF</i>
<i>Penanda auksotrofik</i>			
Biosintesis purin (C)	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	tRNA(gln)
Rasemasi alanin (D)	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>alr</i>
Rasemasi asam glutamat (D)	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>glr</i>
<i>Penanda imunitas</i>			
Resisten nisin (D)	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	NisR
Resisten kadmium (D)	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	Cdr
Resisten Lactacin F (D)	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>lafI</i>
Resisten garam empedu (D)	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lactobacilli</i>	<i>Bsh</i>

D = Seleksi dominan, C = Seleksi komplementasi

(Li dan Han, 2018)

Pemanfaatan teknologi DNA rekombinan pada BAL dengan vektor *food-grade* dapat dijumpai pada penggunaan strain *Lactococcus lactis* dalam pembuatan keju menggunakan vektor pGA1 dari *Pediococcus acidilactici*. Senyawa pediocin PA-1 yang diekspresikan menyebabkan penurunan bakteri patogen *Listeria innocua* SA1 pada akhir pengamatan pengolahan keju. (Reviriego *et al.*, 2007). Pada studi lain, strain *Lactococcus lactis* yang disisipkan plasmid *food-grade* mampu meningkatkan sifat proteolitik dalam proses pematangan keju (Joutsjoki *et al.*, 2002; Wegmann *et al.*, 1999). Pengintegrasian gen *L. lactis* *ilvBN* ke dalam operon laktosa *Lb. casei* melalui rekombinasi homolog memiliki kemampuan dalam memproduksi senyawa flavour diasetil (Gosalbes *et al.*, 2000).

Asam hialuronat juga dapat diproduksi oleh strain *L. lactis* yang mengandung operon biosintesa asam hialuronat, dengan ekspresi gen penginduksi nisin terkendali, serta marker *lacF* dari *Streptococcus zooepidemicus* (Sheng *et al.*, 2015). Ekspresi enzim β -galactosidase pada *Lb. plantarum* hasil rekombinasi vektor *food-grade* dari *Lb. reuteri* dapat dimanfaatkan untuk memproduksi produk susu rendah laktosa (Nguyen *et al.*, 2015). Terakhir, protein rekombinan mabinlin II dari *Capparis masaikai* yang disisipkan pada vektor *food-grade* pNZ8149 dengan marker gen *lacF*, dapat diekspresikan pada *L. lactis* NZ3900 menjadi produk gula substitusi karena memiliki cecap manis (Gu *et al.*, 2015).

Hingga saat ini, pemakaian vektor *food-grade* dalam teknologi DNA rekombinan masih menjadi solusi utama dalam upaya menjamin keamanan produk pangan BAL hasil rekayasa genetika. Hal ini disebabkan peluang terjadinya transfer gen resisten antibiotik yang dapat diminimalisir. Akan tetapi, penerapan metode ini juga masih sangat terbatas. Sebagian besar strain industri juga bersifat resisten terhadap nisin, seleksi strain dengan logam berat yang memiliki potensi bahaya, sulitnya pengendalian untuk seleksi strain dengan monitor suhu dan pemakaian gula, serta sistem resisten fag yang tidak konjugatif (Landete, 2017).

Penerapan kloning berbasis vektor integratif di satu sisi memiliki kestabilan tinggi, namun di sisi lain efisiensi transformasi yang rendah. Efisiensi transformasi juga menurun apabila tidak cocok dengan vektor yang digunakan, dan dapat mengakibatkan kehilangan plasmid bakteri asam laktat alami, yang akan merugikan terutama bila terjadi pada strain industri. Adapun studi di kemudian hari perlu dilakukan untuk mengevaluasi manfaatnya dalam bidang pangan dan kesehatan, misal dalam pengembangan produk probiotik, sekaligus perhitungan analisis ekonominya (Landete, 2017).

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah-Al-Mahin, Sugimoto, S., Higashi, C., Matsumoto, S., and Sonomoto, K. (2010). Improvement of multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 under conditions of thermal stress by heterologous expression of *Escherichia coli* dnaK. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4277–4285.
- Álvarez-Cisneros, Y. M., & Ponce-Alquicira, E. 2018. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria. In *Antimicrobial Resistance-A Global Threat*. IntechOpen.
- Bongers, R. S., Hoefnagel, M. H. N., and Kleerebezem, M. (2005). High-level acetaldehyde production in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1109–1113.
- Chien, L.-J., and Lee, C.-K. (2007). Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 339–346.
- De Vos, W. M., & Simons, G. F. M. 1994. Gene cloning and expression systems in lactococci. In *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria* (pp. 52-105). Springer, Dordrecht.
- Derkx, P. M., Janzen, T., Sørensen, K. I., Christensen, J. E., Stuer-Lauridsen, B., & Johansen, E. 2014. The art of strain improvement of industrial lactic acid bacteria without the use of recombinant DNA technology. In *Microbial cell factories* (Vol. 13, No. 1, p. S5). BioMed Central.
- Gao, C., Ma, C., & Xu, P. (2011). Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology advances*, 29(6), 930-939.
- Gosalbes, M. J., Esteban, C. D., Galán, J. L., & Pérez-Martínez, G. (2000). Integrative food-grade expression system based on the lactose regulon of *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(11), 4822-4828.
- Gu, W., Xia, Q., Yao, J., Fu, S., Guo, J., & Hu, X. (2015). Recombinant expressions of sweet plant protein mabinlin II in *Escherichia coli* and food-grade *Lactococcus lactis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(4), 557-567.
- Johansen, E. 2018. Use of natural selection and evolution to develop new starter cultures for fermented foods.
- Joutsjoki, V., Luoma, S., Tamminen, M., Kilpi, M., Johansen, E., & Palva, A. (2002). Recombinant *Lactococcus* starters as a potential source of additional peptidolytic activity in cheese ripening. *Journal of applied microbiology*, 92(6), 1159-1166.

- Landete, J. M. (2017). A review of food-grade vectors in lactic acid bacteria: from the laboratory to their application. *Critical reviews in biotechnology*, 37(3), 296-308.
- Leenhouts, K., Buist, G., Bolhuis, A., Ten Berge, A., Kiel, J., Mierau, I., ... & Kok, J. (1996). A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes. *Molecular and General Genetics MGG*, 253(1-2), 217-224.
- Li, L., & Han, N. S. (2018). Application of lactic acid bacteria for food biotechnology. *Emerging areas in bioengineering*, 2, 375-398.
- Lu, W., Kong, J., dan Kong, W. 2013. Construction and application of a food-grade expression system for *Lactococcus lactis*. *Molecular biotechnology*, 54(2), 170-176.
- Nguyen, T. T., Nguyen, H. M., Geiger, B., Mathiesen, G., Eijsink, V. G., Peterbauer, C. K., ... & Nguyen, T. H. (2015). Heterologous expression of a recombinant lactobacillal β -galactosidase in *Lactobacillus plantarum*: effect of different parameters on the sakacin P-based expression system. *Microbial cell factories*, 14(1), 30.
- Plavec, T. V., dan Berlec, A. 2020. Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, 8(2), 297.
- Reviriego, C., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2007). A food-grade system for production of pediocin PA-1 in nisin-producing and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains: application to inhibit *Listeria* growth in a cheese model system. *Journal of food protection*, 70 (11), 2512-2517.
- Sheng, J., Ling, P., & Wang, F. (2015). Constructing a recombinant hyaluronic acid biosynthesis operon and producing food-grade hyaluronic acid in *Lactococcus lactis*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 42(2), 197-206.
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Kleerebezem, M., Mierau, I., De Vos, W. M., and Hugenholtz, J. (2003). Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3069–3076.
- Takala, T., Saris, P., & Tynkkynen, S. (2003). Food-grade host/vector expression system for *Lactobacillus casei* based on complementation of plasmid-associated phospho- β -galactosidase gene lacG. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(5), 564-570.
- Trombert, A. 2015. Recombinant lactic acid bacteria as delivery vectors of heterologous antigens: the future of vaccination?. *Beneficial Microbes*, 6(3), 313-324.
- Wegmann, U., Klein, J. R., Drumm, I., Kuipers, O. P., & Henrich, B. (1999). Introduction of peptidase genes from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* into *Lactococcus lactis* and controlled expression. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(11), 4729-4733.
- Ye, W., Huo, G., Chen, J., Liu, F., Yin, J., Yang, L., et al. (2010). Heterologous expression of the *Bacillus subtilis* (natto) alanine dehydrogenase in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*. *Microbiol. Res.* 16