

Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Hemolisin pada Permukaan Daun Pohpohan (*Pilea Melastomoides* (Poir.) Wedd.)

Isolation, Characterization and Identification of Hemolysin-Producing Bacteria on the leaf Surface of Pilea Melastomoides (Poir.) Wedd.

Siti Panesya Nuraeni, Sri Budiarti*, Jepri Agung Priyanto

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Jawa Barat, Indonesia

*corresponding author, Email: s_budiarti@yahoo.com

Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 24/09/2024

Disetujui : 29/12/2024

Abstract

Pohpohan (*Pilea melastomoides* (Poir.) Wedd.) is commonly consumed by Indonesian society as fresh vegetables, which possibly carry foodborne pathogens. This study was aimed to isolate bacteria, characterize, and identify hemolysin-producing bacteria from the surface of *P. melastomoides* leaves. Bacterial quantification on Blood Agar media showed the number of bacteria of $6,2 \times 10^8$ CFU/g. Bacterial colonies with different morphologies were selected and purified for further characterization particularly on the colony and cell morphology. A total of eight selected bacterial isolates has the same colony color, which is white, but varied in shapes, edges, elevations, optical characteristics, and colony surfaces. All bacterial isolates are classified as Gram-positive bacillus-shaped bacteria with a chain or single cell arrangement. The eight selected isolates were able to lyse red blood cells (positive hemolysis) which are 6 isolates were classified as β -hemolysis, and two isolates were α -hemolysis. 16S rRNA sequence analysis showed four isolates (PA7I1, PA8I5, PA8I6.2, PA9I3) were highly similar (similarity: more than 99%) with *Bacillus paramycooides*, two isolates (PA8I7, PA9I5) were identified as *Bacillus subtilis*, and two other isolates (PA8I6, PA9I4) were identified as *Bacillus cereus* and *Bacillus tequilensis*.

Key Words: *Bacillus*, fresh vegetable, hemolysis, pohpohan

Abstrak

Pohpohan (*Pilea melastomoides* (Poir.) Wedd.) umumnya dikonsumsi masyarakat Indonesia sebagai lalapan. Sayuran segar yang dikonsumsi secara langsung kemungkinan dapat membawa bakteri patogen bawaan pangan. Penelitian ini bertujuan mengisolasi bakteri, mengarakterisasi, dan mengidentifikasi bakteri penghasil hemolisin pada permukaan daun pohpohan. Kuantifikasi bakteri pada media *Blood Agar* menunjukkan jumlah bakteri pada permukaan daun pohpohan sebanyak $6,2 \times 10^8$ CFU/g. Koloni bakteri dengan morfologi yang berbeda dipilih dan dimurnikan untuk dikarakterisasi lebih lanjut, meliputi karakter morfologi koloni dan selnya. Sebanyak delapan isolat bakteri terpilih memiliki warna koloni yang sama yaitu putih, namun memiliki bentuk, tepian, elevasi, karakteristik optik, dan permukaan koloni yang bervariasi. Semua isolat bakteri tersebut tergolong bakteri Gram positif berbentuk basil dengan penataan sel berantai atau tunggal. Kedelapan isolat terpilih mampu melisis sel darah merah (hemolisis positif), 6 isolat diantaranya tergolong ke dalam β -hemolisis, dan 2 isolat lainnya tergolong α -hemolisis. Identifikasi molekuler berdasarkan gen 16S rRNA menunjukkan empat isolat (PA7I1, PA8I5, PA8I6.2, PA9I3) memiliki kemiripan sekuens yang tinggi (similarity: lebih dari 99%) dengan bakteri *Bacillus paramycooides*, dua isolat (PA8I7, PA9I5) teridentifikasi sebagai *Bacillus subtilis*, dan dua isolat lainnya (PA8I6, PA9I4) teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus* dan *Bacillus tequilensis*.

Kata kunci: *Bacillus*, hemolisis, pohpohan, sayuran segar

PENDAHULUAN

Sayuran merupakan salah satu bahan pangan yang dapat dikonsumsi secara mentah maupun diolah. Mengonsumsi sayuran mentah memiliki banyak manfaat untuk kesehatan karena nutrisi yang terkandung tidak mengalami perubahan akibat proses pengolahan. Pohpohan atau *Pilea melastomoides* (Poir.) Wedd. merupakan salah satu tanaman sayur yang tumbuh di dataran tinggi Jawa Barat yang umumnya dikonsumsi masyarakat sebagai lalapan.

pohpohan memiliki banyak kandungan seperti alkaloid, polifenolat, flavonoid, monoterpenoid, tannin, seskuiterpenoid, steroid, dan kuinon yang memiliki potensi efek sitotoksik, antimikrob antiparasit, dan antidiabetes (Rahayuningsih *et al.*, 2015; Kodir *et al.*, 2022). Meskipun demikian, sayuran yang dikonsumsi secara segar dapat terkontaminasi beberapa bahan, antara lain pestisida, logam berat, telur cacing, dan mikroba patogen

(Misgiyarta dan Winarti, 2023; Balali *et al.*, 2020; Putri *et al.*, 2020). Sumber kontaminan kemungkinan dapat berasal dari mulai dari proses penanaman, pemanenan, hingga distribusi atau pemasaran sayuran. Jumlah mikroba yang terbawa pada sayuran segar berbeda-beda pada setiap jenis sayur, termasuk kubis, tomat, wortel, selada, cabai merah, dan bawang merah, berkisar antara 10^4 hingga 10^8 CFU/g (Munarso *et al.* 2004; Munarso *et al.*, 2005). Berdasarkan Peraturan BPOM No. 13, tahun 2019, batas maksimal cemaran mikroba pada sayuran adalah 10^5 CFU/g. Oleh karena itu, beberapa jenis sayuran perlu penanganan yang tepat sebelum dikonsumsi untuk mengurangi jumlah mikroba yang terbawa sayuran tersebut.

Mikroba patogen bawaan pangan (*foodborne pathogen*) dapat masuk ke tubuh manusia melalui konsumsi sayuran dan buah-buahan yang terkontaminasi, sehingga dapat menyebabkan penyakit asal pangan (*foodborne disease*) (Misgiyarta dan Winarti 2023). Sebagai contoh, bayam yang terkontaminasi *Escherichia coli* menyebabkan 199 orang di Kanada dan Amerika Serikat mengalami diare, dan 3 orang diantaranya meninggal dunia (Mritunjay dan Kumar 2015). Meskipun di Indonesia belum ada laporan kasus infeksi akibat konsumsi lalapan mentah, namun pada tahun 2007, pernah dilaporkan 5 orang mengalami keracunan setelah mengonsumsi tumis kubis dan tauge (detiknews, 2007). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa sayuran yang dijual di pasar terbuka dan di pinggir jalan Dakar, Senegal, terkontaminasi *E. coli*, *Vibrio* spp., dan *Salmonella* spp. (Sane *et al.*, 2024). Namun, belum ada penelitian serupa di Indonesia. Oleh karena itu, penelitian untuk mengidentifikasi jenis-jenis mikroba, terutama bakteri yang terbawa oleh sayuran pohpohan yang dijual di pasar tradisional perlu dilakukan.

Bakteri patogen merupakan mikroba yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia karena memiliki faktor virulensi, seperti hemolisin dan superantigen (Abdulatieef *et al.*, 2023). Faktor virulensi merupakan parameter molekuler yang memungkinkan terjadinya kolonisasi bakteri, penetrasi, dan perusakan jaringan inang oleh bakteri. Faktor virulensi dapat meningkatkan kemampuan mikroba patogen dalam menghindari pertahanan inang dan menyebabkan penyakit (Leitao, 2020). Protein hemolisin merupakan faktor virulensi dapat menyebabkan kerusakan membran, lisis sel, dan jaringan di sekitarnya untuk menyediakan nutrisi terutama zat besi bagi bakteri (Bullen *et al.*, 2005; Mogrovejo *et al.*, 2020). Aktivitas hemolisis dapat menjadi indikasi awal patogenitas suatu bakteri sehingga uji *in vitro* untuk mendeteksi adanya aktivitas hemolisis dapat dilakukan sebagai langkah awal deteksi cemaran bakteri patogen pada sayuran segar. Rentannya kontaminasi bakteri pada lalapan merupakan permasalahan yang perlu ditangani karena material tersebut dapat menjadi sumber

pembawa patogen, terutama patogen penyebab infeksi saluran pencernaan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri, mengarakterisasi, mengidentifikasi bakteri penghasil hemolisin pada permukaan daun pohpohan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi jumlah bakteri yang terbawa pada sayuran tersebut sehingga prosedur penanganannya dapat dilakukan.

MATERI DAN METODE

Pengambilan sampel

Daun pohpohan segar diperoleh dari satu pasar tradisional. Sampel daun pohpohan yang diambil merupakan bagian daun muda yang biasa dikonsumsi sebagai lalapan. Sampel kemudian diambil sebanyak 10 g dan direndam di dalam 90 ml akuades steril selama 1 jam.

Isolasi dan kuantifikasi bakteri

Isolasi bakteri dilakukan menggunakan metode pengenceran berseri. Air rendaman daun pohpohan diencerkan dengan larutan garam fisiologis (0,85%) yang kemudian diencerkan berseri. Sebanyak 100 μ l dari seri pengenceran 10^{-7} , 10^{-8} , dan 10^{-9} selanjutnya disebar pada media *Blood Agar* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam (Turista dan Puspitasari, 2019). Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dihitung dan dikalikan dengan faktor pengenceran untuk mendapatkan jumlah bakteri dalam CFU/g daun pohpohan. Setiap koloni bakteri yang memiliki aktivitas hemolisis dengan karakter morfologi koloni yang berbeda selanjutnya dimurnikan pada media *Nutrient Agar* (NA).

Karakterisasi morfologi koloni dan sel bakteri

Karakterisasi dilakukan dengan mengamati morfologi koloni yang telah diinkubasi selama 18 jam pada media NA. Karakter koloni yang diamati antara lain bentuk, warna, tepian elevasi, dan permukaan koloni. Morfologi sel bakteri yang telah diinkubasi selama 18 jam, diamati melalui prosedur pewarnaan Gram (Claus 1992). Teknik ini dilakukan untuk mengamati bentuk dan penataan sel serta reaksinya terhadap pewarnaan Gram. Preparat diamati menggunakan mikroskop Cahaya (Olympus CX34) pada perbesaran total 1000X.

Uji hemolisis

Isolat bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam selanjutnya diinokulasi dengan cara digores membulat pada media *Blood Agar* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Adanya aktivitas hemolisis ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri. Aktivitas hemolisis memiliki tiga tipe yaitu lisis sempurna (β -hemolisis); lisis sebagian (α -hemolisis); dan tidak lisis (γ -hemolisis) (Yeh *et al.*, 2009).

Identifikasi bakteri berdasarkan gen 16S rRNA

Sebanyak satu ose koloni isolat bakteri terpilih diinokulasi pada media *Nutrient Broth* 20 ml, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang

menggunakan *shaker* dengan kecepatan agitasi 120 rpm. Masing-masing kultur selanjutnya diambil sebanyak 1,5 ml menggunakan mikropipet, lalu dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi dan disentrifugasi dengan kecepatan 15000 rpm selama 1 menit hingga didapatkan peletnya. Pelet yang didapat selanjutnya digunakan untuk proses isolasi DNA. Isolasi DNA genom bakteri dilakukan menggunakan *Geneaid Presto™ mini gDNA Bacteria Kit* sesuai dengan instruksi kit. DNA hasil isolasi selanjutnya diukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan *NanoDrop spectrophotometer* (MaestroGen). Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan menggunakan primer 63F (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan 1387R (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') (Marchesi *et al.*, 1998). Komponen campuran PCR dibuat dengan volume total 50 µl, yang terdiri atas 25 µl 2X *GoTaq master mix* (Promega, USA), 5 µl Primer 63F, 5 µl Primer 1387R (10 µmol), 1 µl DNA cetakan (~250 ng/µl), dan 14 µl *nuclease free water*. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 siklus, dengan predenaturasi (94 °C, 5 menit), denaturasi (94 °C, 30 detik), annealing (55 °C, 45 detik), elongasi (72 °C, 45 detik), dan post-elongasi (72 °C, 10 menit). Amplikon selanjutnya dilakukan pada mesin elektroforesis dengan tegangan 70V selama 30 menit dengan konsentrasi agarose 1,5%. Hasil elektroforesis kemudian diamati pada gelDoc. Amplikon yang diperoleh selanjutnya disekuensing melalui jasa di PT. Genetika Science Indonesia. Hasil sekuensing selanjutnya dianalisis menggunakan BlastN yang tersedia pada website National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah bakteri pada permukaan daun pohpohan

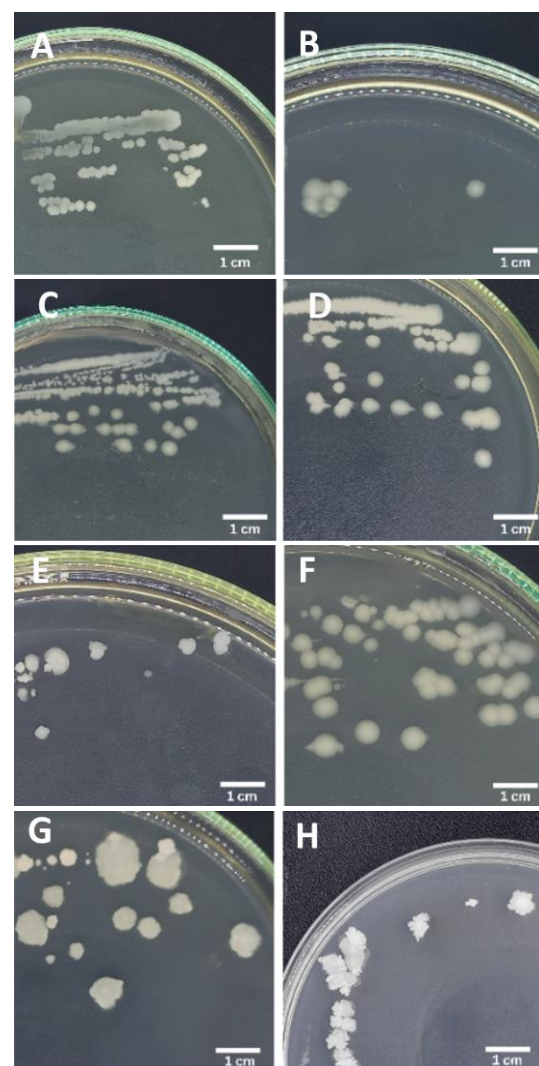
Pohpohan merupakan jenis sayuran yang umum dikonsumsi dalam bentuk sayuran segar sebagai lalapan di Indonesia. Jumlah cemaran bakteri pada sayuran dapat dipengaruhi oleh kondisi prapanen dan pascapanen (Gil *et al.*, 2015). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa permukaan daun pohpohan mengandung bakteri sebanyak $6,2 \times 10^8$ CFU/g. Jumlah tersebut merupakan jumlah total bakteri, baik bakteri hemolisis positif maupun hemolisis negatif.

Cemaran mikrob pada sayuran dapat berasal dari air yang digunakan untuk irigasi, pupuk, kompos, feses, dan debu (Balali *et al.*, (2020). Oleh karena itu, tingkat kebersihan sayuran perlu diperhatikan untuk menghindari jumlah mikrob yang terbawa pada sayuran tersebut. Hasil kuantifikasi bakteri pada penelitian ini menunjukkan bahwa permukaan daun pohpohan mengandung $6,2 \times 10^8$ CFU/g. Hal ini mengindikasikan bahwa jumlah bakteri tersebut melebihi batas maksimal cemaran mikrob yang ditentukan oleh BPOM. Berdasarkan Peraturan BPOM No. 13, tahun 2019, batas maksimal cemaran mikrob pada sayuran adalah 10^5 CFU/g. Oleh karena itu, sayuran tersebut perlu dibersihkan

terlebih dahulu sebelum dikonsumsi. Selain dapat dibersihkan dengan air mengalir, prosedur lain, seperti penggunaan *sanitizer* juga dapat dilakukan. Misgiyarta dan Winarti (2023) melaporkan bahwa teknik sanitizer menggunakan natrium hipoklorit 100 ppm dan 0,5% asam asetat efektif dalam mengurangi jumlah mikrob kontaminan pada selada, wortel, dan tomat, hingga dibawah batas maksimal cemaran mikrob.

Karakter morfologi bakteri

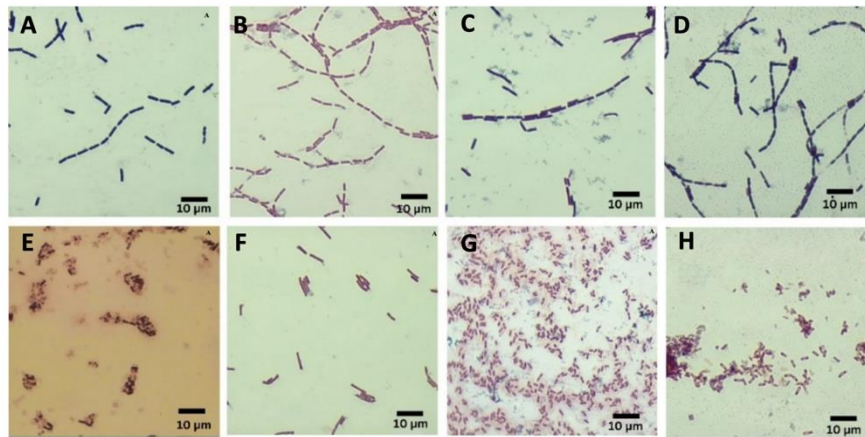
Isolat-isolat bakteri yang telah diisolasi dari permukaan daun pohpohan telah dikarakterisasi berdasarkan morfologi koloni dan selnya. Delapan isolat terpilih memiliki karakter morfologi koloni yang bervariasi (Gambar 1). Perbedaan morfologi koloni dan sel dapat mengindikasikan perbedaan kelompok bakterinya. Di sisi lain, hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa seluruh isolat tersebut tergolong kelompok bakteri Gram positif yang ditandai dengan warna biru hingga ungu dengan bentuk sel batang dan penataan sel tunggal atau berantai (Tabel 1).



Gambar 1. Morfologi koloni isolat bakteri penghasil hemolisin pada permukaan daun pohpohan.

Tabel 1. Karakter morfologi koloni dan sel bakteri dari permukaan daun pohpohan

No	Kode isolat	Morfologi koloni					Morfologi sel		
		Warna koloni	Bentuk	Elevasi	Tepian	Karakteristik optik	Permukaan koloni	Bentuk, penataan sel	Gram
1	PA7I1	Putih kekuningan	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>	<i>Opaque</i>	<i>Smooth</i>	Batang, berantai	Positif
2	PA8I5	Putih kekuningan	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>	<i>Opaque</i>	<i>Smooth</i>	Batang, berantai	Positif
3	PA8I6	Putih kekuningan	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>	<i>Opaque</i>	<i>Smooth</i>	Batang, berantai	Positif
4	PA8I6.2	Putih kekuningan	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>	<i>Opaque</i>	<i>Smooth</i>	Batang, berantai	Positif
5	PA8I7	Putih susu	<i>Iregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Undulate</i>	<i>Opaque</i>	<i>Smooth</i>	Batang, tunggal	Positif
6	PA9I3	Putih kekuningan	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>	<i>Opaque</i>	<i>Smooth</i>	Batang, tunggal	Positif
7	PA9I4	Putih kekuningan	<i>Iregular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>	<i>Opaque</i>	<i>Smooth</i>	Batang, tunggal	Positif
8	PA9I5	Putih susu	<i>Iregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Undulate</i>	<i>Opaque</i>	<i>Smooth</i>	Batang, tunggal	Positif



Gambar 2. Morfologi sel delapan isolat bakteri dari permukaan daun pohpohan yang diamati pada mikroskop Cahaya perbesaran 1000X. (A)PA7I1, (B) PA8I5, (C) PA8I6, (D) PA8I6.2, (E) PA8I7, (F)PA9I3, (G) PA9I4, (H) PA9I5.

Sebanyak delapan isolat bakteri terpilih memiliki karakter morfologi koloni yang beragam dalam hal berupa warna, bentuk, elevasi, tepian yang berbeda, namun memiliki kesamaan dalam hal karakteristik optik dan permukaan koloni yaitu opaque dan smooth (Tabel 1). Selain itu, seluruh isolat tergolong bakteri Gram positif karena selnya terwarnai ungu melalui pewarnaan Gram dan memiliki bentuk sel yang sama yaitu basil dengan penataan sel yang berbeda-beda (tunggal atau berantai) (Gambar 2).

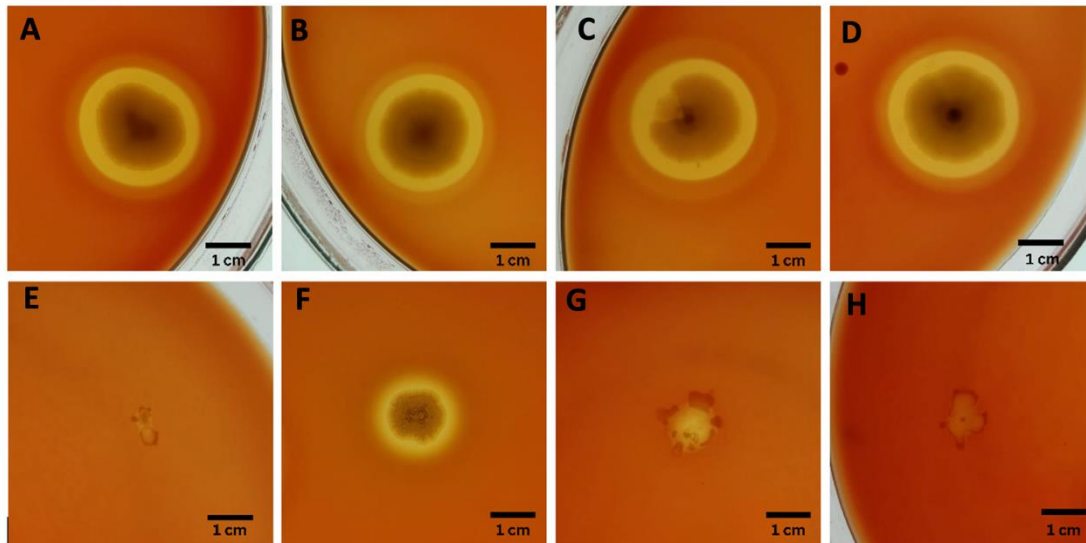
Kemampuan hemolisis

Sebanyak 8 isolat bakteri tergolong hemolisis positif karena mampu melisiskan sel darah merah yang diindikasikan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni (Gambar 3). Enam isolat diantaranya tergolong ke dalam β-hemolisis, dan 2 isolat lainnya tergolong α-hemolisis. (Tabel 2). Terbentuknya zona bening terjadi karena bakteri menghasilkan protein

hemolisin yang dapat merusak membran sel darah merah sehingga menyebabkan lisis (Susilowati et al., 2021). Adanya aktivitas hemolisis pada delapan isolat tersebut mengindikasikan kemungkinan isolat-isolat tersebut tergolong patogen. Namun, penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengonfirmasi patogenisitas dari isolat-isolat tersebut.

Tabel 2. Kemampuan hemolisis bakteri asal permukaan daun pohpohan

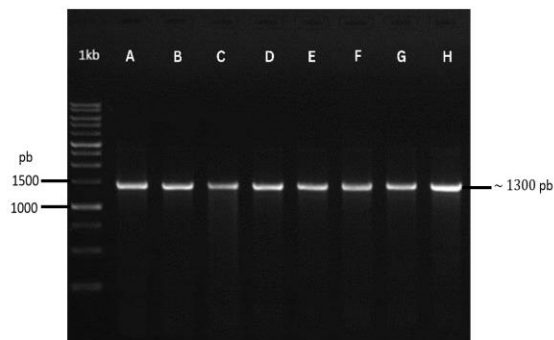
No	Kode isolat	Karakter hemolisis
1	PA7I1	β
2	PA8I5	β
3	PA8I6	β
4	PA8I6.2	β
5	PA8I7	α
6	PA9I3	β
7	PA9I4	β
8	PA9I5	α



Gambar 3. Kemampuan hemolisis isolat bakteri dari permukaan daun pohpohan. (A)PA7I1, (B) PA8I5, (C) PA8I6, (D) PA8I6.2, (E) PA8I7, (F) PA9I3, (G) PA9I4, (H) PA9I5.

Identitas molekuler 8 isolat bakteri terpilih

Amplifikasi gen 16S rRNA menghasilkan amplicon berukuran sekitar 1300 pb (Gambar 4). Hasil analisis BlastN menunjukkan empat isolat (PA7I1, PA8I5, PA8I6.2, PA9I3) memiliki kemiripan sekuens yang tinggi (similarity: lebih dari 99%) dengan bakteri *Bacillus paramycoides*, dua isolat (PA8I7, PA9I5) teridentifikasi sebagai *Bacillus subtilis*, dan dua isolat lainnya (PA8I6, PA9I4) teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus* dan *Bacillus tequilensis* (Tabel 3).



Gambar 4. Fragmen gen 16S rRNA isolat bakteri dari permukaan daun pohpohan. M: Marker DNA (1 Kb), A: PA7I1, B: PA8I5, C: PA8I6, D: PA8I6.2, E: PA8I7, F: PA9I3, G: PA9I4, H: PA9I5.

Delapan isolat bakteri dari permukaan daun pohpohan telah diidentifikasi secara molekuler berdasarkan gen 16S rRNA. Berdasarkan analisis tersebut, delapan isolat tersebut memiliki kemiripan tertinggi dengan genus *Bacillus*. Hasil identifikasi ini mendukung hasil karakterisasi secara morfologi koloni dan sel bakteri yang menunjukkan bahwa ke delapan isolat tergolong bakteri Gram positif dengan sel berbentuk batang. Berdasarkan identifikasi

molekuler, empat isolat (PA7I1, PA8I5, PA8I6.2, PA9I3) memiliki kemiripan sekuens yang tinggi (similarity: lebih dari 99%) dengan bakteri *Bacillus paramycoides*, dua isolat (PA8I7, PA9I5) teridentifikasi sebagai *Bacillus subtilis*, dan dua isolat lainnya (PA8I6, PA9I4) teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus* dan *Bacillus tequilensis*. *Bacillus* merupakan salah satu kelompok bakteri yang umum ditemukan di tanah dan mampu menghasilkan endospora sehingga dapat bertahan hidup pada kondisi lingkungan yang kering (Hening et al. 2024). Berdasarkan penelitian sebelumnya, *B. cereus* dan *B. subtilis* pernah dilaporkan mampu menginfeksi manusia. *B. cereus* mampu menghasilkan enterotoksin dan dapat menyebabkan diare, *pneumonia*, *bacteremia*, *endophthalmitis*, *necrotizing fasciitis*, *osteomyelitis*, dan *endocarditis* (Bottone, 2010; Yu et al., 2020; Dietrich et al., 2020). Bakteri ini dapat ditemukan di tanah, air, tumbuhan, hewan, serta di lingkungan bersuhu tinggi (Kumari dan Sarkar, 2016; Yennie et al., 2022). Bakteri lainnya yaitu *B. subtilis*. Bakteri ini dapat menyebabkan penyakit *septicemia*, *pneumonia*, *endocarditis*, luka infeksi dan meningitis (Ozkocaman et al., 2006; Tokano et al., 2023). Selain dua jenis bakteri tersebut, dua bakteri lainnya yang telah diisolasi dari permukaan daun pohpohan yaitu *B. tequilensis* dan *B. paramycoides*. Kedua bakteri tersebut belum pernah dilaporkan patogenitasnya. Meskipun demikian, Jenis bakteri yang diisolasi dari lingkungan yang berbeda dapat memiliki sifat fisiologis yang berbeda pula. Oleh karena itu penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk menganalisis patogenitas masing-masing isolat-isolat yang telah diisolasi dari permukaan daun pohpohan ini.

Tabel 3. Identitas molekuler delapan isolat bakteri dari permukaan daun pohpohan berdasarkan sekuens gen 16S rRNA

No	Isolat	Spesies	E-value	similarity/Query cover (%)	No. akses
1	PA7I1	<i>Bacillus paramycoides</i> strain ML114-2	0.0	99,03/100	MN544929.1
2	PA8I5	<i>Bacillus paramycoides</i> strain 2883	0.0	99,34/100	MT611845.1
3	PA8I6	<i>Bacillus cereus</i> strain JJBVR05	0.0	99,11/100	OP604570.1
4	PA8I6.2	<i>Bacillus paramycoides</i> strain 2883	0.0	99,36/99	MT611845.1
5	PA8I7	<i>Bacillus subtilis</i> strain M408f10-3MF9	0.0	99,68/100	OR574169.1
6	PA9I3	<i>Bacillus paramycoides</i> strain 2883	0.0	99,05/100	MT611845.1
7	PA9I4	<i>Bacillus tequilensis</i> strain G128	0.0	99,52/100	PP809069.1
8	PA9I5	<i>Bacillus subtilis</i> strain VV2	0.0	99,45/100	KX838367.1

SIMPULAN

Delapan isolat bakteri dengan aktivitas hemolisis ditemukan pada permukaan daun pohpohan yang berasal dari pasar tradisional. Sebanyak delapan isolat terpilih berbentuk batang dan termasuk dalam bakteri Gram positif. Identifikasi molekuler menunjukkan 4 isolat memiliki kemiripan tertinggi dengan bakteri *Bacillus paramycoides*, 2 isolat mirip dengan *Bacillus subtilis*, serta 2 isolat lainnya yaitu *Bacillus cereus* dan *Bacillus tequilensis*.

DAFTAR REFERENSI

- Abdulateef, S.A., Owaif, H.A.A., & Hussein, M.H. 2023. Importance of virulence factors in bacterial pathogenicity: a review. *IJMCRS*, 3(4), pp. 765-769.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM). 2019. Peraturan badan pengawas obat dan makanan nomor 13 tahun 2019 tentang batas maksimal cemaran mikroba dalam pangan olahan. https://standarpangan.pom.go.id/dokumen/peraturan/2019/PerBPOM_No_13_Tahun_2019_tentang_Batas_Maksimal_Cemaran_Mikrobiologi.pdf. Diakses 23 Desember 2024.
- Balali, G.I., Yar, D.K., Dela, V.G.A., & Adjei-Kusi, P. 2020. Microbial contamination, an increasing threat to the consumption of fresh fruits and vegetables in today's world. *Int J Microbiol*, pp. 1-13.
- Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 23, pp. 382–398
- Bullen, J.J., Rogers, H.J., Spalding, P.B., & Ward, C.G. 2005. Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 43, pp. 325–330.
- Claus, D. 1992. A standardized Gram staining procedure. *World J Microbiol Biotechnol*. 8, pp. 451–452.
- DetikNews. 2007. Usai Makan Tumis Kol, Sekeluarga Keracunan <https://news.detik.com/berita-jawa-timur/d-825991/usai-makan-tumis-kol-sekeluarga-keracunan>. Diakses 23 Desember 2024.
- Dietrich, R., Jessberge, N., Ehling-Schulz, M., Märtlbauer, E., & Granum, P.E. The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*, 13(98), pp. 1-50.
- Gil, M.I., Selma, M.V., Suslow, T., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., & Allende, A. 2015. Pre- and postharvest preventive measures and intervention strategies to control microbial food safety hazards of fresh leafy vegetables. *Crit Rev Food Sci Nut*, 55(4), pp. 453–468.
- Hening, E.N.W., Priyanto, J.A., Prastya, M.E., Astuti, R.I., Hasidu, L.O.A.F., Jamilah. 2024. Soil bacteria from Muna Island, Southeast Sulawesi, Indonesia: Antibacterial and antibiofilm activities, and the presence of antibiotic-biosynthetic genes. *J App Pharm Sci*. 14(06), pp. 207-217.
- Kodir, R.A., & Moektiwardoyo, M. 2022. Health benefits of three wild leafy vegetables in “lalapan” as sundanese traditional and ethnic foods. *IJBP*, 2(1), pp. 37-43.
- Kumari, S., & Sarkar, P.K. 2016. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Cont*, 69, pp. 20-29.
- Leitao, J.H. 2020. Microbial virulence factors. *IJMS*, 21(5320), pp. 1-6.

- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Him, D.J., & Wade, W.G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 64(2), pp. 795-799.
- Misgiyarta, Winarti C. 2023. Pengendalian kontaminan mikroba pada sayuran segar dengan formula sanitizer dari natrium hipoklorit dan asam asetat. *Teknotan*. 17(1), pp 43-51.
- Mogrovejo, D.C., Perini, L., Gostin car, C., Sepčić, K., Turk, M., Ambrožič, Avguštin, J., Brill, F.H.H & Gunde-Cimerman, N. 2020. Prevalence of antimicrobial resistance and hemolytic phenotypes in culturable arctic bacteria. *Front Microbiol*, 11(570), pp. 1-13.
- Mritunjay, S.K., & Kumar. 2015. Fresh farm produce as a source of pathogens: a review. *Res J Environ. Toxicol*, 9(2), pp. 59-70.
- Munarso, S.J., Misgiyarta., R. Nurjanah., Murtiningsih., E. Mulyono., Suismono., Syaifullah., D. Amiyarsi., S. Nugraha dan S.I. Kailaku. 2004. Penelitian perilaku kontaminan pada komoditas sayuran. Laporan Akhir Penelitian 2004. BB. Litbang Pasacapanen Pertanian. Bogor.
- Munarso, S.J., Misgiyarta., Syaifullah., Murtiningsih., Miskiyah, W. Haliza., Suismono., E. Mulyono., S. Nugraha., D. Amiyarsi., R. Nurjanah., Widaningrum., P. Yuwono., S.I. Kailaku dan A. Budiyo. 2005. Identifikasi kontaminan dan perbaikan mutu sayuran. Laporan Akhir Penelitian 2005. BB. Litbang Pasacapanen Pertanian. Bogor
- Ozkocaman, V., Ozcelik, T., Ali, R., Ozkalemkas, F., Ozkan, A., Ozakin, C., Akalin, H., Ursavas, A., Coskun, F., Ener, B., & Tunali, A. 2006. *Bacillus* spp. among hospitalized patients with haematological malignancies: clinical features, epidemics and outcomes. *J Hosp Infect*, 64(2), pp. 169-176.
- Putri U, Hanina, Fitri AD. 2020. Kontaminasi soil transmitted heminths pada sayuran kubis dan selada di pasar tradisional kota Jambi. *E-SEHAD*. 1(1), pp.58-64.
- Rahayuningsih, N., & Amelia, S. 2015. Uji aktivitas antidiabetes infusa daun pohpohan (*Pilea trinervia Wight.*) pada mencit putih jantan galur swiss webster. *JKBTH*, 13(1), pp. 89-94.
- Sane, S., Tene, S.D., Diouara, A.A.M., Coundoul S., Mbengue, M., Dieye, Y. 2024. Bacterial community in fresh fruits and vegetables sold in streets and open-air markets of Dakar, Senegal. *BMC Microbiol*. 24, pp. 1-14. (2024).
- Susilowati, D.N., Rahayuningsih, S., Sofiana, I., & Radiastuti, N. 2021. The potential of nutmeg's microbes (*Myristica fragrans* Houtt.) as antagonistic agents against rigidoporus microporus. *JLSO: Journal of Suboptimal Lands*, 10(1), pp. 1-13.
- Tokano, M., Tarumoto, N., Imai, K., Sakai, J., Maeda, T., Kawamura, T., Seo, K., Takahashi, K., Yamamoto, T., & Maesaki, S. 2023. Bacterial meningitis caused by *Bacillus subtilis* var. natto. *Intern Med*, 62(13), pp. 1989-1993.
- Turista & Puspitasari. The growth of *Staphylococcus aureus* in the blood agar plate media of sheep blood and human blood groups A, B, AB, and O. 2019. *J Technol Laboratory*, 8(1), pp. 1-7.
- Yeh, E., Pinsky, BA., Banaei, N., & Baron, E.J. 2009. Hair sheep blood, citrated or defibrinated, fulfills all requirements of blood agar for diagnostic microbiology laboratory tests. *PLoS ONE*, 4(7), pp. 1-8.
- Yennie, Y., Hariyadi. R.D., Kusumaningrum, H.D., & Poernomo, A. 2022. Kontaminasi *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus* pada susui di tingkat ritel di wilayah jabodetabek. *JPHPI*, 25(2), pp. 331-344.
- Yu, S., Yu, P., Wang, J., Li, C., Guo, H., Liu, C., Kong, L., & Yu, L. 2020. A study on prevalence and characterization of *Bacillus cereus* in ready-to-eat foods in China. *Front Microbiol*, 10(3043), pp. 1-1.