

Deteksi Bakteri Gram-Negatif Pada Permukaan Daun Kemangi (*Ocimum basilicum*) dari Tiga Pasar Tradisional di Bogor

Detection of Gram-Negative Bacteria on the Leaf Surface of Basil (*Ocimum basilicum*) Collected from Three Traditional Markets in Bogor

ZERINA GETRIANI, JEPRI AGUNG PRIYANTO, SRI BUDIARTI*

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

Diterima 27 September 2023/Diterima dalam Bentuk Revisi 10 November 2023/Disetujui 13 November 2023

Ocimum basilicum or basil is commonly consumed raw by Indonesian. However, it is easily contaminated by pathogenic bacteria. This study aimed to detect Gram-negative bacteria in basil leaves obtained from three traditional markets in Bogor. Isolation and quantification of bacteria using serial dilution showed that the average number of bacteria on the surface of basil leaves was 9.6×10^7 CFU/g. Basil leaves obtained from the second traditional market had the highest number of bacteria of 11.3×10^7 CFU/g. All isolated bacteria have the same morphology namely bacilli, then further purified and characterized physiologically. The nine bacterial isolates obtained were able to grow on the selective-differential media including *Salmonella-Shigella* agar (SSA), bismuth sulphite agar (BSA), and eosin-methylen blue (EMBA). Gram staining showed that all bacterial isolates were classified as Gram-negative bacteria. The hemolytic ability of bacterial isolates was tested using blood agar base media, three out of nine bacterial isolates were able to produce hemolysin. Molecular identification based on 16S rRNA sequences showed that the bacterial isolates belonged to the *Providencia* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., and *Kluyvera* sp.

Key words: basil, Gram-negative bacteria, hemolysin, 16S rRNA

PENDAHULUAN

Sayuran yang dikonsumsi tanpa proses pengolahan mudah terkontaminasi dan membawa bakteri patogen yang dapat menyebabkan berbagai penyakit (Zamani *et al.* 2017). Kemangi (*Ocimum basilicum*) merupakan salah satu tanaman sayur yang umumnya dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia secara mentah sebagai lalapan. Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa daun kemangi dan beberapa jenis sayuran lainnya seperti *Ipomea aquatica*, dan *Lactuca sativa* var. *acephala* yang dijual di pasar tradisional Makong Delta, Vietnam terdeteksi membawa bakteri *Salmonella* sp. (Nguyen *et al.* 2021). Diantara berbagai jenis bakteri, kelompok bakteri Gram-negatif terutama *Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp. diharapkan tidak terbawa pada daun kemangi yang akan dikonsumsi langsung. Hal ini karena bakteri-bakteri tersebut dapat menyebabkan berbagai penyakit. *E. coli* yang menginfeksi saluran

pencernaan manusia dapat menyebabkan diare (Gomes *et al.* 2016). *Pseudomonas aeruginosa* dapat menyebabkan diare dan penyakit fibrosis kistik pada manusia (Matsuura *et al.* 2018). *Salmonella* sp. merupakan bakteri penyebab diare yang disertai dengan demam dan sakit kepala (Popa & Popa 2021). Oleh karena itu, keberadaan bakteri-bakteri tersebut pada sayuran perlu dicegah atau dikurangi jumlahnya.

Sifat patogen yang dimiliki oleh bakteri disebabkan oleh adanya faktor virulensi antara lain faktor adhesi (fimbriae, lipopolisakarida, dan kapsul), faktor invasi, toksin (endotoksin dan eksotoksin), dan faktor penghindar sistem imunitas inang (Abdulateef *et al.* 2023). Berdasarkan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 13 Tahun 2019 tentang Batas Maksimal Cemaran Mikroba dalam Pangan Olahsan menyatakan bahwa batas maksimum cemaran mikroba khususnya *E. coli*, *Salmonella* sp., dan *Listeria Monocytogenes*, berturut-turut adalah 3 APM/g, negatif/25 g, dan $<10^2$ koloni/g.

Kemangi umumnya dikonsumsi oleh masyarakat dalam bentuk mentahan sebagai lalapan, sehingga tingkat kebersihan dan keamanan sayuran tersebut

*Penulis korespondensi:
E-mail: s_budiharti@yahoo.com

perlu diperhatikan. Sayuran yang aman dikonsumsi adalah sayuran yang bebas dari patogen. Meskipun demikian, tingkat kebersihan dan keamanan kemangi yang dijual dipasaran cukup beragam yang kemungkinan dipengaruhi oleh penanganan dari mulai proses penanaman, pemanenan, hingga pemasaran. Pasar tradisional menjadi tempat pemasaran sayuran dari pedagang ke konsumen umumnya memiliki tingkat kebersihan dan sanitasi yang bervariasi. Kebersihan lingkungan yang rendah dapat meningkatkan resiko terbawanya bakteri patogen ke sayuran yang dijual. Penelitian ini bertujuan mendeteksi bakteri Gram-negatif pada permukaan daun kemangi (*Ocimum basilicum*) dari tiga pasar tradisional di Bogor. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai cemaran bakteri pada daun kemangi dari tiga pasar tradisional di Bogor, sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk penanganan atau pengolahan daun kemangi sebelum dikonsumsi.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian. Penelitian ini dilakukan pada Agustus 2022-Februari 2023 di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University.

Pengambilan Sampel. Daun kemangi segar diperoleh dari tiga pasar tradisional di Bogor (Pasar 1, Pasar 2, dan Pasar 3). Masing-masing sampel tersebut selanjutnya dikemas dalam kantong plastik steril dan dibawa ke laboratorium untuk dianalisis.

Isolasi dan kuantifikasi Bakteri. 25 g daun kemangi segar direndam dalam 250 ml akuades steril selama satu jam. Selanjutnya, isolasi bakteri dilakukan dengan menggunakan metode pengenceran berseri menggunakan larutan garam fisiologis (0,85%) hingga pengenceran 10^{-5} kali. Lalu, 100 μ l hasil pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} kali disebarkan pada media nutrient agar (NA). Selain itu, air rendaman daun kemangi juga digores kuadran menggunakan lup inokulasi pada media selektif *Salmonella Shigella* Agar (SSA), bismuth sulphite agar (BSA), dan eosin-methylen blue agar (EMBA). Seluruh cawan selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang $\pm 28^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Jumlah bakteri setiap sampel dihitung menggunakan rumus dibawah ini:

$$\text{Jumlah bakteri (CFU/g)} = \frac{\text{Jumlah koloni bakteri}}{\text{Berat sampel yang digunakan (g)}} \times \text{Faktor pengenceran}$$

Karakterisasi Bakteri.

Karakterisasi Warna Koloni. Isolat bakteri yang tumbuh pada media selektif SSA, BSA, dan EMBA hasil dari penggoresan air rendaman yang telah diinkubasi selama 24 jam diamati warna koloninya.

Karakterisasi Fisiologis. Karakterisasi fisiologis bakteri dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat bakteri pada media *triple sugar iron agar* (TSIA) dan *Simmon's citrate agar*. Masing-masing isolat bakteri ditumbuhkan pada Media TSIA (5,5 g/L) untuk mengetahui kemampuan bakteri tersebut dalam memfermentasi glukosa, laktosa, sukrosa, dan produksi gas H_2S , sedangkan uji penggunaan sitrat dilakukan pada media *Simmon's citrate agar* (2,25 g/L). Hasil positif pada media TSIA ditunjukkan dengan perubahan media menjadi merah-hitam yang mengindikasikan bakteri mampu memproduksi H_2S atau perubahan media menjadi merah-kuning yang mengindikasikan bakteri mampu menggunakan gula jenis glukosa, laktosa, sukrosa, sedangkan indikator positif pada uji penggunaan sitrat ditunjukkan dengan perubahan warna media dari hijau menjadi biru.

Pewarnaan Gram. Koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18 jam diwarnai dengan metode pewarnaan Gram, dan diamati di bawah mikroskop cahaya. Morfologi sel yang diamati meliputi bentuk sel, penataan sel, dan reaksinya terhadap pewarnaan Gram.

Uji Hemolisis. Koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18 jam digores pada media *Blood Agar Base*, lalu diinkubasi suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Adanya reaksi hemolisis diindikasikan oleh terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri. Hasil uji hemolisis pada media *blood agar base* dapat digolongkan ke dalam tiga jenis reaksi hemolisis, antara lain lisis sempurna (β -hemolisis); lisis sebagian (α -hemolisis); tidak lisis atau negatif (γ -hemolisis).

Identifikasi Molekuler. Sembilan isolat bakteri terpilih yang tumbuh pada media selektif (SSA, BSA, EMBA) diidentifikasi berdasarkan sekuens gen 16S rRNA. DNA genom bakteri tersebut diisolasi menggunakan kit Genaid Presto™ mini gDNA. Tahapan isolasi dilakukan dengan mengikuti instruksi prosedur kit. DNA hasil isolasi diukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan spektrofotometer nanodrop (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') dengan ukuran

target ampikon 1.500 pb (Marchesi *et al.*1998). Campuran PCR dibuat dengan mencampurkan 25 µl 2X GoTaq *master mix*, 5 µl primer 63F (10 µM), 5 µl primer 1387R, 1 µl DNA *Template*, dan 14 µl *Nuclease-free Water*. Kondisi PCR dilakukan dengan kondisi predenaturasi (94°C, 5 menit), dan dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi (94°C, 30 detik), annealing (55°C, 45 detik), elongasi (72°C, 45 detik), dan diakhiri dengan post-elongasi (72°C, 10 menit) (Priyanto *et al.* 2023). Produk PCR selanjutnya divisualisasikan pada elektroforesis agarose 1,5% pada tegangan 50 V selama 50 menit. Produk PCR selanjutnya disekuensing melalui PT. Genetika Science Indonesia. Sekuens masing-masing isolat selanjutnya dianalisis menggunakan BlastN yang tersedia pada laman: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

HASIL

Jumlah Bakteri pada Permukaan Daun Kemangi. Jumlah bakteri pada permukaan daun kemangi yang diperoleh dari tiga pasar tradisional di Bogor beragam (Tabel 1). Daun kemangi yang dikoleksi dari pasar 2 memiliki jumlah bakteri tertinggi, yaitu $11,3 \times 10^7$ CFU/g, sedangkan daun kemangi yang dikoleksi dari pasar 1 memiliki jumlah bakteri paling sedikit, yaitu $8,5 \times 10^7$ CFU/g.

Pertumbuhan Isolat Bakteri dari Daun Kemangi pada Media Selektif. Berdasarkan hasil isolasi menggunakan teknik kuadran pada media selektif (SSA, BSA, dan EMBA), sembilan isolat bakteri dengan morfologi koloni yang berbeda telah berhasil dimurnikan. Masing-masing isolat bakteri memiliki warna koloni yang berbeda-beda (Tabel 2). Isolat bakteri P1.1.2, P2.1.2, P3.1.2 mampu tumbuh pada media SSA dan BSA. Pada media SSA koloni isolat-isolat tersebut berwarna hitam, sedangkan pada media BSA berwarna silver metalik. Beberapa isolat lain yang hanya ditumbuhkan pada media SSA atau EMBA juga telah dimurnikan. Koloni isolat P1.1, P2.1, dan P3.1 yang tumbuh pada media SSA berwarna bening/tidak berwarna, sedangkan isolat bakteri P1.3, P2.3, dan P3.3 yang tumbuh pada media EMBA koloninya berwarna hijau metalik.

Tabel 1. Jumlah bakteri pada permukaan daun kemangi dari tiga pasar tradisional di Bogor

Pasar tradisional	Jumlah bakteri (CFU/g)
Pasar 1	$8,5 \times 10^7$
Pasar 2	$11,3 \times 10^7$
Pasar 3	$9,0 \times 10^7$

Karakter Fisiologis. Berdasarkan hasil uji pada media TSIA, tiga isolat bakteri (P1.1.2, P2.1.2, dan P3.1.2) merupakan bakteri yang mampu memfermentasikan glukosa saja dan menghasilkan gas H₂S diindikasikan dengan perubahan warna medium menjadi merah-hitam. Isolat lainnya (P1.3, P2.3, dan P3.3) merupakan bakteri yang dapat memfermentasikan glukosa saja, dan tidak menghasilkan H₂S diindikasikan dengan perubahan medium menjadi merah-kuning. Disisi lain, 3 isolat lainnya (P1.1, P2.1, dan P3.1) merupakan bakteri yang tidak mampu memfermentasi gula (glukosa, sukrosa, dan lakosa) sehingga menunjukkan reaksi negatif terhadap uji TSIA (tidak ada perubahan warna media) (Tabel 2). Disisi lain, tujuh isolat bakteri (P1.1.2, P1.3, P2.1.2, P3.1.2, P1.1, P2.1, dan P3.1) mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon pada media Simmon's citrate agar (SSA) yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna media dari hijau menjadi biru, sedangkan 2 isolat lainnya (P2.3 dan P3.3) menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna media (Tabel 2).

Morfologi Sel Bakteri. Seluruh isolat bakteri yang telah diisolasi dari permukaan daun kemangi termasuk ke dalam kelompok bakteri Gram negatif ditunjukkan dengan warna orange/merah dengan bentuk sel batang pendek dan penataan sel tunggal (Gambar 1).

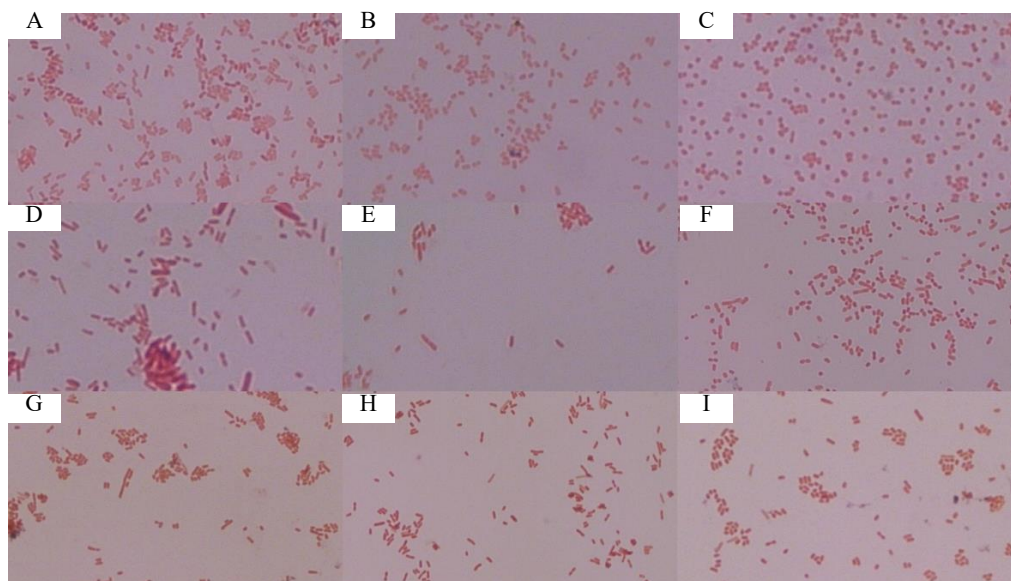
Kemampuan Hemolisis. Tiga dari sembilan isolat bakteri yang diisolasi dari permukaan daun kemangi memiliki kemampuan untuk melisis sel darah merah (Tabel 3). Hal ini diindikasikan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri. Isolat bakteri P1.1.2 dan P2.1.2 menunjukkan reaksi β-hemolisis, sedangkan isolat P3.1.2 menunjukkan reaksi α-hemolisis. Isolat-isolat bakteri lainnya (P1.1, P2.1, P3.1, P1.3, P2.3 dan P3.3) negatif homolisis (γ-hemolisis) karena tidak menghasilkan zona bening disekitar koloninya.

Identifikasi Molekular. Hasil amplifikasi gen 16S rRNA pada Sembilan isolat bakteri dari permukaan daun kemangi telah diperoleh produk PCR berukuran ~1.500 pb (Gambar 2). Analisis BlastN menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Providencia rettgeri*, *Providencia vermicola*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fulva*, *Proteus mirabilis*, dan *Kluyvera sp.* dengan tingkat kemiripan sekuens yang beragam dari 82,14 % hingga 99,92% (Tabel 4).

Tabel 2. Karakter morfologi dan fisiologi sembilan isolat dari permukaan daun kemangi yang diperoleh dari tiga pasar tradisional di Bogor

Pasar tradisional	Isolat bakteri	Warna koloni pada media yang berbeda			Bentuk	Penataan sel	TSIA	Sitrat
		SSA	BSA	EMBA				
Pasar 1	P1.1.2	Hitam, tepi tidak berwarna, media berwarna kuning	Silver metalik, media gelap	TD	Batang pendek	Tunggal	M-H	+
	P1.1	Tidak berwarna, media berwarna kuning	TD	TD	Batang pendek	Tunggal	-	+
	P1.3	TD	TD	Hijau metalik	Batang pendek	Tunggal	M-K	+
	P2.1.2	Hitam, tepi tidak berwarna, media berwarna kuning	Silver metalik, media gelap	TD	Batang pendek	Tunggal	M-H	+
Pasar 2	P2.1	Tidak berwarna, media berwarna kuning	TD	TD	Batang pendek	Tunggal	-	+
	P2.3	TD	TD	Hijau metalik	Batang pendek	Tunggal	K-M	-
	P3.1.2	Hitam tepi tidak berwarna, media berwarna kuning	Silver metalik, media gelap	TD	Batang pendek	Tunggal	M-H	+
Pasar 3	P3.1	Tidak berwarna, media berwarna kuning	TD	TD	Batang pendek	Tunggal	-	+
	P3.3	TD	TD	Hijau metalik	Batang pendek	Tunggal	M-K	-

-. Negatif, +: Positif, TD: Tidak diamati, M/H: Merah/Hitam, M/K: Merah/Kuning



Gambar 1. Morfologi sel bakteri dari permukaan daun kemangi yang dikoleksi dari tiga pasar tradisional di Bogor. Morfologi sel diamati pada mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000X. A: P1.1.2, B: P2.1.2, C: P3.1.2, D: P1.2, E: P2.2, F: P3.2, G: P1.3, H: P2.3, I: P3.3

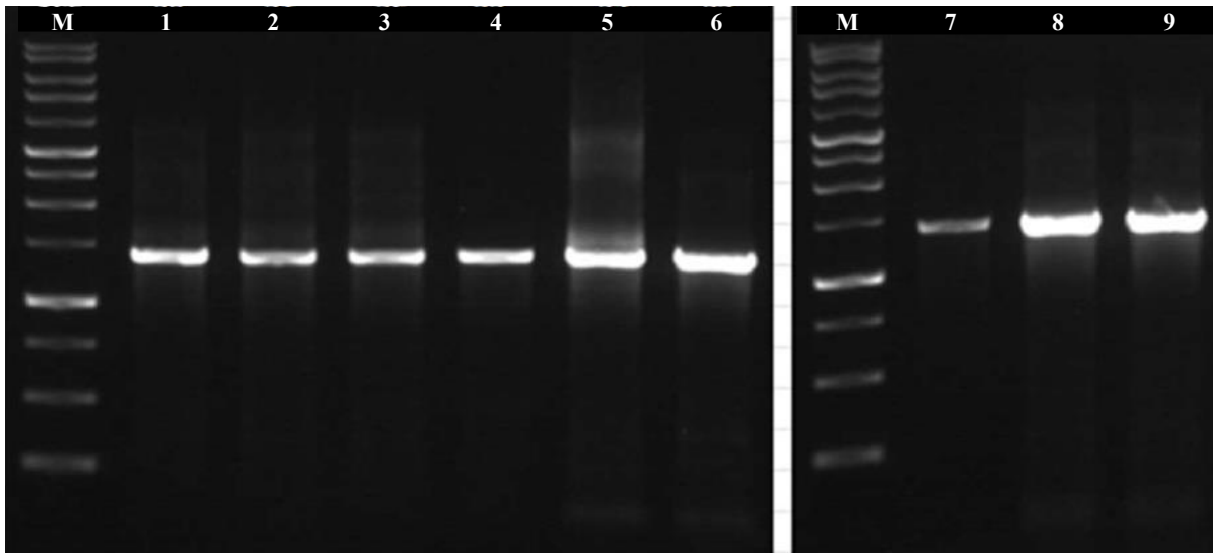
Tabel 3. Karakter hemolisis sembilan isolat bakteri yang diisolasi dari permukaan daun kemangi

Isolat bakteri	Karakter hemolisis*
P1.1.2	β
P1.1	γ
P1.3	γ
P2.1.2	β
P2.1	γ
P2.3	γ
P3.1.2	α
P3.1	γ
P3.3	γ

β -hemolisis: lisis sempurna, α -hemolisis: lisis sebagian, γ -hemolisis: tidak lisis

PEMBAHASAN

Permukaan daun kemangi yang diperoleh dari tiga pasar tradisional di Bogor memiliki jumlah bakteri yang berbeda-beda, berkisar antara $8,5 \times 10^7$ hingga $11,3 \times 10^7$ CFU/g. Jumlah total bakteri tersebut melebihi batas maksimum bakteri pada sayuran kering yang telah ditetapkan oleh Badan Standarisasi Nasional Indonesia yaitu 1×10^5 CFU/g (SNI 2009). Banyaknya jumlah bakteri yang terbawa pada sayuran dapat meningkatkan



Gambar 2. Fragmen gen 16S rRNA dari sembilan isolat bakteri yang diisolasi dari permukaan daun kemangi yang divisualisasikan pada agarose 1,5%. M: 1 Kb DNA marker; 1: P1.1.2; 2: P2.1.2; 3: P3.1.2; 4: P1.1; 5: P2.1; 6: P3.1; 7: P1.3; 8: P2.3; 9: P3.3

Tabel 4 Identitas isolat bakteri dari permukaan daun kemangi berdasarkan gen 16S rRNA

Pasar tradisional	Isolat	Spesies	Query cover (%)	kemiripan (%)	E-Value
Pasar 1	P1.1.2	<i>Providencia rettgeri</i> strain RS39	100	99,92	0,0
	P1.2	<i>Pseudomonas putida</i> strain NY5709	99	99,83	0,0
	P1.3	<i>Kluyvera</i> sp. strain WA10-100-2	99	99,61	0,0
Pasar 2	P2.1.2	<i>Proteus mirabilis</i> strain CIFRI.C4	100	96,41	0,0
	P2.2	<i>Providencia vermicola</i> strain A57	100	92,28	0,0
	CK3	<i>Kluyvera</i> sp. strain WA10-100-2	100	99,69	0,0
Pasar 3	P3.1.2	<i>Providencia rettgeri</i> strain RS39	99	82,14	0,0
	P3.2	<i>Pseudomonas fulva</i> strain 14	99	99,69	0,0
	P3.3	<i>Kluyvera</i> sp. strain WA10-100-2	100	99,77	0,0

resiko penyakit pada konsumen. Oleh karena itu, jumlah cemaran bakteri pada daun kemangi yang diperoleh dari tiga pasar tersebut perlu dikurangi hingga batas aman, antara lain dapat dilakukan melalui pencucian sayuran dengan air mengalir, dan meningkatkan kebersihan pasar. Hutasoit (2020) menyatakan sanitasi lingkungan berpengaruh pada makanan yang akan dikonsumsi. Umumnya bakteri penyebab penyakit diare yaitu *Escherichia coli* ditemukan pada makanan dengan sanitasi lingkungan yang rendah. Hitungan cawan langsung umum dilakukan untuk mengetahui jumlah cemaran bakteri pada pangan (Lambrechts *et al.* 2014).

Pada penelitian ini, keberadaan bakteri-bakteri Gram negatif pada permukaan daun kemangi dideteksi menggunakan media selektif dan diferensial. Media SSA digunakan untuk mendeteksi keberadaan *Salmonella* sp. dan *Shigella* sp. media BSA digunakan untuk mengisolasi *Salmonella* spp. Media EMBA digunakan untuk mengisolasi bakteri Gram-negatif, khususnya bakteri koliform fekal dan nonfekal. Hasil isolasi menunjukkan adanya pertumbuhan koloni bakteri pada masing-masing medium tersebut. Isolat bakteri (P1.1.2, P2.1.2, P3.1.2) yang tumbuh pada media SSA memiliki koloni berwarna hitam diikuti

dengan perubahan warna media menjadi kuning (Tabel 2). Isolat bakteri P1.2, P2.2, dan P3.2 yang tumbuh pada media SSA warna koloninya bening/tidak berwarna (*colorless*). Berdasarkan warna koloni bakteri yang tumbuh pada media tersebut diduga isolat dengan warna koloni hitam dan bening berturut-turut adalah *Salmonella* sp., dan *Shigella* sp. Namun, meskipun media tersebut termasuk ke dalam media selektif-diferensial, beberapa bakteri Gram negatif masih dapat tumbuh pada media tersebut, seperti *E. coli* (koloni merah muda), *Enterobacter/Klebsiella* (koloni merah muda), *Proteus* (koloni bening/*colorless*), *Pseudomonas* (koloni merah muda) (Rall *et al.* 2005; Park *et al.* 2012). Selain itu, media *Bismuth Sulfite Agar* juga digunakan untuk mendeteksi cemaran bakteri *Salmonella* sp. atau bakteri Gram negatif lainnya pada daun kemangi. Hasil isolasi dari permukaan daun kemangi pada medium ini menunjukkan adanya pertumbuhan koloni bakteri berwarna silver metalik dan diikuti dengan perubahan warna koloni menjadi cokelat gelap seiring penambahan masa inkubasi. Warna koloni tersebut mengindikasikan bahwa kemungkinan permukaan daun kemangi membawa cemaran bakteri *Salmonella* sp. karena bakteri tersebut

memiliki warna koloni yang sama pada media BSA (Yenestria *et al.* 2019). Meskipun demikian, jenis bakteri lainnya juga dapat memiliki warna koloni yang sama pada media tersebut, misalnya *Proteus mirabilis* (Chat *et al.* 2019). Selain itu, pada permukaan daun kemangi juga terdeteksi adanya kelompok bakteri Enterobacteriaceae karena ditemukan adanya pertumbuhan koloni berwarna hijau metalik pada media EMBA. Bakteri-bakteri dengan warna koloni hijau metalik diduga adalah kelompok *E. coli*. Namun, bakteri lain yaitu *Kluyvera* sp. juga memiliki warna koloni hijau metalik pada media EMBA (Luttrell *et al.* 1988; Warren *et al.* 2000).

Isolat-isolat yang telah diperoleh juga dikarakterisasi sifat fisiologisnya menggunakan media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) dan *Simmon's Citrate Agar*. Uji TSIA dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan H₂S dan melakukan fermentasi terhadap glukosa, sukrosa dan laktosa. Isolat bakteri P1.1.2, P2.1.2, dan P3.1.2 mampu produksi H₂S pada media TSIA yang ditunjukkan oleh perubahan media menjadi merah-hitam (Tabel 2). Umumnya bakteri Gram-negatif memberikan hasil positif pada uji TSIA. Bakteri Gram-negatif yang mampu produksi H₂S pada media TSIA, antara lain *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp. (Thompson *et al.* 2018). Disisi lain, isolat bakteri P1.1, P2.1, P3.1 hanya mampu memfermentasi glukosa pada media TSIA yang ditandai dengan perubahan warna media menjadi merah-kuning. Sifat ini umumnya dimiliki oleh kelompok *Shigella* sp. (Stanley *et al.* 2017). Karakter fisiologis lain dari sembilan isolat bakteri yang telah diisolasi dari permukaan daun kemangi diuji menggunakan media *Simmon's Citrate Agar*. Pengujian sitrat dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon utamanya. Uji sitrat umumnya dilakukan untuk identifikasi bakteri Gram-negatif, seperti *Salmonella* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, dan *Bacteroides fragilis* (Washington II dan Timm 1976; Rahman *et al.* 2019).

Sembilan isolat bakteri yang telah diisolasi menggunakan tiga media yang berbeda (SSA, BSA, dan EMBA) telah dikarakterisasi morfologi sel dan reaksinya terhadap pewarnaan Gram. Seluruh isolat bakteri tergolong ke dalam kelompok bakteri Gram negatif karena terwarnai orange/merah. Isolat-isolat tersebut memiliki bentuk sel yang sama yaitu batang pendek dengan penataan sel tunggal. Selain itu, untuk menginvestigasi virulensi dari isolat-isolat tersebut, uji hemolisis telah dilakukan. Kemampuan bakteri bakteri Gram-negatif dalam menghasilkan faktor hemolisin dapat menjadi salah satu faktor virulensi dari bakteri tersebut (Soltanighias *et al.* 2019).

Hasil uji hemolisis menunjukkan bahwa tiga dari sembilan isolat bakteri dari daun kemangi memiliki kemampuan melisis sel darah merah. Hal ini mengindikasikan keberadaan isolat-isolat tersebut pada daun kemangi bisa mengganggu kesehatan manusia, sehingga perlu penanganan daun kemangi yang tepat sebelum dikonsumsi. Penelitian sebelumnya juga telah melaporkan bahwa karakter hemolisis positif juga dimiliki oleh beberapa kelompok bakteri Gram negatif antara lain, *Proteus mirabilis* (Younis *et al.* 2016), *Bartonella bacilliformis*, dan *Babesia microti* (Orf & Cunnington 2015).

Sembilan isolat bakteri dari permukaan daun kemangi juga telah diidentifikasi berdasarkan gen 16S rRNA. Berdasarkan analisis tersebut, sembilan isolat bakteri tergolong ke dalam beberapa spesies yaitu *Providencia rettgeri strain* RS39, *Providencia vermicola strain* A57, *Kluyvera* sp., *Pseudomonas putida strain* NY5709, *Pseudomonas fulva strain* 14, dan *Proteus mirabilis*. Spesies-spesies tersebut tergolong ke dalam bakteri Gram negatif dan beberapa diantaranya telah dilaporkan bersifat patogen. *P. rettgeri* dan *P. vermicola* merupakan bakteri patogen penyebab diare (Yoh *et al.* 2005; Shima *et al.* 2016). *P. fulva* pernah dilaporkan sebagai bakteri penginfeksi system peredaran darah dan penyebab demam (Seok *et al.* 2010). *P. mirabilis* dapat menyebabkan diare pada manusia disertai dengan mual dan sakit kepala (Gong *et al.* 2019). *Kluyvera* sp. merupakan bakteri patogen Gram-negatif yang menyebabkan penyakit diare dan pankreatitis pada manusia (Carter & Evans 2005).

Penelitian ini telah berhasil mendeteksi keberadaan bakteri Gram negatif dari permukaan daun kemangi yang diperoleh dari tiga pasar tradisional di Bogor. Tiga dari sembilan isolat bakteri Gram negatif yang diperoleh kemungkinan besar bersifat patogen karena bersifat hemolisis positif. Identifikasi molekuler telah mengkonfirmasi bahwa bakteri-bakteri tersebut teridentifikasi sebagai sebagai *Providencia rettgeri*, *Providencia vermicola*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fulva*, *Proteus mirabilis*, dan *Kluyvera* sp. Bakteri-bakteri ini diduga sebagai penyebab diare. Namun, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menginvestigasi patogenisitas dari masing-masing isolat tersebut. Hasil penelitian ini juga dapat menjadi landasan untuk meningkatkan kebersihan daun kemangi di pasar tradisional agar lebih aman dikonsumsi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat (LPPM) Universitas Sembilanbelas November Kolaka atas pendanaan yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdulateef SA, Owaif HAA, Hussein MH. 2023. Importance of virulence factors in bacterial pathogenicity: a review. *International Journal of Medical Science and Clinical Research* 3:765-769.
- [BPOM] Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2019. Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 13 Tahun 2019 tentang Batas Maksimal Cemaran Mikroba dalam Pangan Olahan. Tersedia di: <https://peraturan.go.id/files/bn751-2019.pdf>. [Diakses tanggal: 15 Oktober 2023]
- Carter JE, Evans TN. 2005. Clinically significant *Kluyvera* infections. *American Journal of Clinical Pathology* 123:334-338. <https://doi.org/10.1309/61XP4KTLJYWM5H35>
- Chat ME, Dadah AJ, Uba A. 2019. Isolation of enteric bacteria from various sources in selected poultry farms in Kaduna State. *Bioprocess Engineering* 3:1-5. <https://doi.org/10.11648/j.be.20190301.11>
- Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, Ferreira LCS, Martinez MB. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology* 47:3-30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Gong Z, Shi X, Bai F, He X, Zhang H, Li Y, Wan Y, Lin Y, Qiu Y, Chen Q, Hu Q, Cao H. 2019. Characterization of a novel diarrheagenic strain of *Proteus mirabilis* associated with food poisoning in China. *Frontiers in Microbiology* 10: 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02810>
- Hutasoit DP. 2020. Pengaruh sanitasi makanan dan kontaminasi bakteri *Escherichia coli* terhadap penyakit diare. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada* 9:779-786. <https://doi.org/10.35816/jiskh.v12i2.399>
- Lambrechts AA, Human IS, Doughari JH, Lues JFR. 2014. Bacterial contamination of the hands of food handlers as indicator of hand washing efficacy in some convenient food industries. *Pakistan Journal of Medical Science* 30:755-758. <https://doi.org/10.12669/pjms.304.4400>
- Luttrell RE, Rannick GA, Hernandez JLS, Verghese A. 1988. *Kluyvera* species soft tissue infection: case report an review. *Journal of Clinical Microbiology* 26:2650-2651. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.12.2650-2651.1988>
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterian 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 64:795-799. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.795-799.1998>
- Matsuura K, Hiramatsu S, Taketani R, Ishibashi K, Uraoka M, Baba S, Nakamura A, Takihara H, Ueda C, Inoue T. 2018. Medical treatment of postendoscopic submucosal dissection phlegmonous gastritis in an elderly diabetic woman with myelodysplastic syndrome. *Case Reports in Gastrointestinal Medicine* 2018:1-5. <https://doi.org/10.1155/2018/8046817>
- Nguyen TK, Bui HT, Truong TA, Lam DN, Ikeuchi S, Ly LKT, Hara-Kudo Y, Taniguchi T, Hayashidani H. 2021. Retail fresh vegetables as a potential source of Salmonella infection in the Mekong Delta, Vietnam. *International Journal of Food Microbiology* 341:1-4. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109049>
- Orf K, Cunningham AJ. 2015. Infection-related hemolysis and susceptibility to Gram-negative bacterial co-infection. *Frontiers in Microbiology* 6:666. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00666>
- Park SH, Ryu S, Kang DH. 2012. Development of an improved selective and differential medium for isolation of *Salmonella* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 50:3222-3226. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-12>
- Popa GL, Popa MI. 2021. *Salmonella* spp. Infection-a continuous threat worldwide. *Germes* 11:88-96. <https://doi.org/10.18683/germes.2021.1244>
- Priyanto JA, Prastya ME, Astuti RI, Kristiana R. 2023. The antibacterial and antibiofilm activities of the endophytic bacteria associated with *Archidendron pauciflorum* against multidrug-resistant strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 195:6653-6674. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04382-4>
- Rahman MA, Haque A, Ahmad T, Mahmud S, Sohana SN, Hossain MR, Barman NC, Badiruzzaman M, Hossain T, Haque MS, Uddin ME, Ahmed R. 2019. Isolation, identification and antibiotic sensitivity pattern of *Salmonella* spp. from locally isolated egg samples. *American Journal of Pure and Applied Biosciences* 1:1-11. <https://doi.org/10.34104/ajpab.2019.0111>
- Rall VLM, Rall R, Aragon LC, da Silva MG. 2005. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for Salmonella detection in poultry. *Brazilian Journal of Microbiology* 36:147-150. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822005000200009>
- Seok Y, Shin H, Lee Y, Cho I, Na S, Yong D, Jeong SH, Lee K. 2010. First report of bloodstream infection caused by *Pseudomonas fulva*. *Journal of Clinical Microbiology* 48:2656-2657. <https://doi.org/10.1128/JCM.01609-09>
- Shima A, Hinenoya A, Samosornsuk W, Samosornsuk S, Mungkornkaew N, Yamasaki S. 2016. Prevalence of *Providencia* strains among patients with diarrhea and in retail meats in Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 69:323-325. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.224>
- Soltanighias T, Singh AEA, Satpute SK, Banpurkar AG, Koolivand A, Rahi P. 2019. Assessment of biosurfactant-producing bacteria from oil contaminated soils and their hydrocarbon degradation potential. *Environmental Sustainability* 2:285-296. <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00074-0>
- Stanley PL, Winslow TA, Pillay I. 2017. Detection of presumptive pathogens in ground beef from supermarket and farmers' market sources. *Georgia Journal of Science* 75:1-11.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 2009. Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Pangan. Indonesia: BSNi.
- Thompson R, Perry JD, Stanforth SP, Dean JR. 2018. Rapid detection of hydrogen sulfide produced by pathogenic bacteria in focused growth media using SHS-MCC-GC-IMS. *Microchemical Journal* 140:232-240.
- Yenestria SM, Rahmiani RP, Wibisono FJ, Effendi MH. 2019. Detection of invA gene of *Salmonella* from milkfish (*Chanos chanos*) at Sidoarjo wet fish market, Indonesia, using polymerase chain reaction technique. *Veterinary World* 12:170-175. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.170-175>
- Yoh M, Matsuyuma J, Ohnishi M, Takagi K, Miyagi H, Mori K, Park KS, Ono T, Honda T. 2005. Importance of *Providencia* species as a major cause of travellers' diarrhea. *Journal of Medical Microbiology* 54:1077-1082. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45846-0>
- Younis KM, Usup G, Ahmad A. 2016. Secondary metabolites produced by marine streptomyces as antibiofilm and quorum-sensing inhibitor of uropathogen *Proteus mirabilis*. *Environmental Science and Pollution Research* 23:4756-4767. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5687-9>
- Warren JR, Farmer III JJ, Dewhirst FE, Birkhead K, Zembower T, Peterson LR, Sims L, and Bhattacharya M. 2000. Outbreak of nosocomial infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing strains of enteric group 137, a new member of the family Enterobacteriaceae closely related to *Citrobacter farmer* and *Citrobacter amalonicus*. *Journal of Clinical Microbiology* 38:3946-3952. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.11.3946-3952.2000>
- Washington II J, Timm JA. 1976. Unclassified, citrate-positive member of the family Enterobacteriaceae resembling *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 4:165-167. <https://doi.org/10.1128/jcm.4.2.165-167.1976>
- Zamani M, Vahedi A, Maghdouri Z, Shirvani JS. 2017. Role of food in environmental transmission of *Helicobacter pylori*. *Caspian Journal International Medical* 8:135-145.