

Aktiviti Antibakteria *Lactiplantibacillus* sp. SUK1-Terbitan Susu Manusia dan Produk Bakteriosin Separa Tulen terhadap *Porphyromonas gingivalis*
(Antibacterial Activity of *Lactiplantibacillus* sp. SUK1-derived Human Milk and its Semi-pure Bacteriocin Product against *Porphyromonas gingivalis*)

ZALEHA SHAFIEI¹, NORAZIAH MOHAMAD ZIN^{2*}, NUR DINI MUHAMAD ADLI², FATIN NUR MAZIDA SALWA MAZLAN², MOHD NIZAM LANI³ & ZAMIRAH ZAINAL ABIDIN¹

¹Jabatan Diagnostik Kraniofasial dan Biosains, Fakulti Pergigian, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Raja Muda Abdul Aziz, 50300 Kuala Lumpur, Malaysia

²Pusat Kajian Diagnostik, Terapeutik & Penyiasatan, Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia 50300 Kuala Lumpur, Malaysia

³Fakulti Perikanan dan Sains Makanan, Universiti Malaysia Terengganu, 21030 Kuala Nerus Terengganu Malaysia

Diserahkan: 31 Oktober 2023/Diterima: 16 Mei 2024

ABSTRAK

Penemuan probiotik daripada susu badan manusia dapat memberi manfaat dalam mengurangkan kebolehhajangan *P. gingivalis*. Kajian ini dijalankan untuk mengenal pasti potensi *Lactiplantibacillus* sp. yang dipencil daripada susu badan manusia untuk mengurangkan kebolehhajangan *P. gingivalis* seterusnya mencirikan *Lactiplantibacillus* sp. yang paling berpotensi mempunyai aktiviti antibakteria. Sepuluh koloni spesies *Lactiplantibacillus* dengan ciri Gram-positif berbentuk bacillus, katalase negatif dan oksidase negatif dikenal pasti, namun hanya tiga koloni telah dipilih yang dikenali sebagai *Lactiplantibacillus* sp. SUK1, SUK2, SUK3 dan diuji aktiviti antibakteria terhadap *P. gingivalis*. Larutan kultur sel *Lactiplantibacillus* sp. SUK1 menunjukkan perencatan yang kuat pada ujian *Spot Lawn* (29.33 ± 1.16 mm) dan difusi telaga agar (51.33 ± 4.73 mm), tetapi tiada aktiviti dalam ujian difusi telaga agar yang menggunakan supernatan tanpa sel yang dineutralkan dan yang tidak dineutralkan. Walau bagaimanapun, supernatan tanpa sel yang dipekatkan menunjukkan zon perencatan (13.0 ± 0.07 mm). Bakteriosin separa tulennya yang diekstrak daripada pemendakan ammonium sulfat (80%) telah merencat *P. gingivalis* secara berkesan, dengan pertumbuhan terendah sebanyak 40.3% pada kepekatan bakteriosin 0.8%. Analisis penjujukan 16S rRNA mencirikan *Lactiplantibacillus* sp. SUK1 sebagai *Lactiplantibacillus pentosus* strain 124-2 dengan 99.87% persamaan. *Lactiplantibacillus* sp. SUK1 yang dipencil daripada susu badan manusia mempunyai ciri probiotik dengan merencat pertumbuhan *P. gingivalis* dan bakteriosinnya dapat digunakan sebagai bahan alternatif dalam produk penjagaan kebersihan mulut bagi mencegah dan merawat penyakit periodontium.

Kata kunci: Antibakteria, bakteriosin separa tulen; *Lactiplantibacillus* sp. SUK1; penjujukan 16S rRNA; *Porphyromonas gingivalis*

ABSTRACT

The discovery of probiotics from human milk could be beneficial to prevent chronic periodontitis by controlling *P. gingivalis* infection. This study was conducted to identify the potential of *Lactiplantibacillus* spp. isolated from human milk with antibacterial activities in reducing the infectivity of *P. gingivalis* and followed by the characterisation of the most potent *Lactiplantibacillus* sp. Ten colonies of *Lactiplantibacillus* species with characteristics of Gram-positive bacteria in the form of bacillus, catalase-negative and oxidase-negative were identified, however, only three colonies were selected and designated as *Lactiplantibacillus* sp. SUK1, SUK2, SUK3, and tested the antibacterial activity against *P. gingivalis*. *Lactiplantibacillus* sp. SUK1 cells culture suspension showed strong inhibitory activity in the *Spot Lawn* test (29.33 ± 1.16 mm) and agar well diffusion assay (51.33 ± 4.73 mm), but no activity in agar well diffusion assay using neutralised and non-neutralised cell-free supernatants. However, the concentrated

cell-free supernatant exhibited the zone of inhibition (13.0 ± 0.07 mm). The partially purified bacteriocin extracted from ammonium sulphate precipitation (80%) effectively inhibited *P. gingivalis*, with the lowest growth of 40.3% at 0.8% concentration of the bacteriocin. The 16S rRNA sequencing analysis characterised the *Lactiplantibacillus* sp. SUK1 as *Lactiplantibacillus pentosus* strain 124-2 with a 99.87% similarity. In conclusion, *Lactiplantibacillus* sp. SUK1 isolated from human milk has probiotic properties inhibiting *P. gingivalis* growth and its bacteriocin could be used as an alternative material for oral hygiene care products to prevent and treat periodontal disease.

Keywords: Antibacteria; *Lactiplantibacillus* sp. SUK1; partial purified bacteriocin; *Porphyromonas gingivalis*; 16S rRNA sequencing

PENGENALAN

Penyakit periodontium iaitu gingivitis dan periodontitis merupakan penyakit keradangan kronik yang memusnahkan tisu tulang dan gusi yang menyokong gigi. Gingivitis adalah sejenis penyakit periodontium yang ringan, namun jika ia tidak dirawat boleh membawa kepada periodontitis yang lebih teruk dengan menyebabkan gigi menjadi longgar, seterusnya kehilangan gigi (Zhang, Ding & Guo 2022).

Porphyromonas gingivalis adalah bakteria oral yang memainkan peranan penting dalam periodontitis dengan menyerang tisu periodontium dan mengelak sistem pertahanan perumah (Bostanci & Belibasakis 2012). Ubat kumur komersial mengandungi 0.12% klorheksidin yang digunakan sebagai piawai emas bagi rawatan periodontitis memberi kesan dengan mewarnakan permukaan gigi, lidah dan memberi reaksi alergik (Balagopal & Arjunker 2013). Justeru, probiotik dan produk metabolitnya menjadi salah satu sumber alternatif bermanfaat yang banyak dikaji dan menjadi fokus utama penyelidikan kerana tidak menyebabkan risiko kerintangan antibiotik.

Probiotik adalah mikroorganisma hidup yang apabila dibekalkan dalam jumlah yang mencukupi dapat memberi manfaat kesihatan kepada perumah (WHO 2014). Terapi probiotik dapat mengurangkan risiko kolonisasi oleh patogen oral tanpa mengurangkan mikrobiota baik.

Produk metabolit probiotik iaitu bakteriosin adalah protein antibakteria yang mempunyai pelbagai spektrum aktiviti, cara tindakan, berat molekul, permulaan genetik dan kandungan biokimia (Grazia et al. 2017). Ia juga boleh dijadikan sebagai alternatif atau pelengkap kepada antibiotik biasa berdasarkan aktiviti sasaran yang sempit, kestabilan tinggi dan ketoksikan yang rendah (Lopetuso et al. 2019).

Lactobacillus species merupakan salah satu probiotik berpotensi yang dikaji pesat oleh para penyelidik. Kajian lepas melaporkan bahawa *Lactobacillus* spp. berupaya merencat pertumbuhan bakteria patogen seperti *Pseudomonas aeruginosa* (Jamalifar et al. 2011), *Shigella* spp. (Mirnejad et al. 2013), *Clostridium difficile* (McFarland 2015), *Escherichia coli* (Kumar et al. 2016), *Staphylococcus aureus* (Kang et al. 2017) dan *Streptococcus mutans* (Ahn et al. 2018). Bakteriosin dua-peptida daripada *Lactobacillus plantarum* NC8 (PLNC8 α dan β), menunjukkan dwi-tindakan dengan bertindak sebagai agen antimikrob yang kuat membunuh *P. gingivalis* dan sebagai faktor perangsang yang menggalakkan percambahan tisu sel perumah (Bengtsson et al. 2017). Walau bagaimanapun, kajian kesan interaksi antara probiotik dan produk metabolitnya terhadap *P. gingivalis* sangat sedikit.

Secara amnya, susu badan manusia atau susu ibu adalah cecair kompleks yang menyediakan nutrien penting dan bahan bioaktif untuk pertumbuhan dan perkembangan bayi (Ballard & Morrow 2013). Susu ibu menjadi sumber semula jadi bakteria asid laktik untuk bayi baru lahir melalui penyusuan susu ibu dan boleh dianggap sebagai makanan sinbiotik. Bacteria asid laktik yang dipencilkan daripada susu ibu, seperti *Lactobacillus gasseri* dan *Enterococcus faecium* didapati selamat dan berpotensi sebagai probiotik dalam mencegah penyakit berjangkit pada bayi baru lahir (Martin et al. 2003).

Penyelidikan aktiviti antibakteria oleh bakteria asid laktik (LAB) daripada pencilan susu badan manusia terhadap patogen oral sangat menarik, kerana ia berpotensi menjurus kepada pembangunan pendekatan inovatif dalam mencegah dan merawat jangkitan oral. Justeru, kajian ini dijalankan bertujuan mengkaji aktiviti antibakteria sel spesies *Lactiplantibacillus*

daripada pencilan susu badan manusia, campuran produk metabolit dalam supernatan tanpa sel dan produk bakteriosin separa tulennya terhadap *P. gingivalis* dengan mengukur zon perencatan melalui ujian *Spot Lawn*, ujian difusi telaga agar dan menentukan nilai kepekatan perencatan minimumnya.

BAHAN DAN KAEDAH

KELULUSAN ETIKA

Kaedah kajian telah dinilai dan diluluskan oleh ahli jawatankuasa etika penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia (nombor rujukan IRB: UKM PPI/111/8/JEP-2021-789).

PEMENCILAN PROBIOTIK DARIPADA SAMPEL SUSU IBU

Sampel susu ibu diambil daripada lima orang wanita sihat (berumur antara 33-38 tahun), yang melahirkan bayi baru yang sihat dalam tempoh 1- 4 bulan di Selangor, Malaysia. Mereka yang menerima rawatan antibiotik dalam tempoh empat minggu sebelumnya, berpenyakit mulut dan sistemik, perokok dan peminum alkohol dikecualikan daripada kajian ini. Kawasan puting dan areola payudara penderma dinyahkuman dengan 70% etanol dan sebanyak 5 mL susu dikumpulkan dalam tiub steril menggunakan pam payudara steril, disimpan dalam kotak berisi pek ais, dan diangkut ke makmal dalam masa 4 jam.

Pemencilan bakteria asid laktik (LAB) dilakukan dengan menginkubasi sampel susu ibu dalam kaldu de Man, Rogosa dan Sharpe (MRS) (1:20 v/v) pada suhu 37 °C selama 48 jam secara anaerobik. Kemudian, pencairan bersiri skala sepuluh kali ganda dilakukan dan 0.1 mL daripada pencairan (10^{-5} hingga 10^{-8}) diplat secara sebaran pada medium agar MRS secara triplikat dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam secara anaerobik. Strain LAB terpilih iaitu SUK1, SUK2 dan SUK3 disubkultur dan disimpan sebagai stok bakteria dalam 20% gliserol untuk kajian lanjut. Ujian biokimia untuk strain LAB terpilih ini dilakukan menggunakan pewarnaan Gram, ujian katalase dan oksidase.

PENYEDIAAN MEDIA DAN KULTUR BAKTERIA

P. gingivalis ATCC 33277, agen utama penyebab penyakit gusi digunakan sebagai penunjuk strain. Medium cecair piawai iaitu infusi jantung otak (BHI) dan kaldu soya tryptikas (TS) diperkaya dengan

suplemen sistein, hemin dan menadion (vitamin K) untuk menggalakkan pertumbuhan *P. gingivalis* dan diinkubasi pada suhu 37 °C secara anaerobik di dalam jar anaerobik yang mengandungi paket anaerogen dan resazurin, iaitu penentu oksigen.

Probiotik *Lactobacillus casei* strain Shiota (pencilan daripada susu kultur komersil, LcY) (Yakult, Malaysia) dan 0.12% khlorheksidin glukonat (Oradex, Malaysia) digunakan sebagai kawalan positif untuk perbandingan dengan sampel ujian penyelidikan.

UJIAN AKTIVITI ANTIBAKTERIA

TEKNIK SPOT LAWN

Sebagai permulaan kajian, sebanyak tiga strain digunakan iaitu strain SUK1, SUK2 dan SUK3 yang mempunyai ciri *Lactiplantibacillus* spp. (nama lama: *Lactobacillus* spp.) iaitu Gram-positif, berbentuk bacillus, keputusan negatif untuk ujian katalase dan oksidasi, dipilih untuk menentukan keupayaannya merencat pertumbuhan *P. gingivalis* menggunakan teknik *Spot Lawn*. Agar BHI-TS disebarikan sekata dengan kultur piawai *P. gingivalis* pada ketumpatan optik (OD) 600 nm pada bacaan 0.8 - 1.0 bersamaan 10^9 CFU/mL (Tsou et al. 2019). Sebanyak 3 μ L kultur *Lactiplantibacillus* sp. yang telah diinkubasi dalam kaldu MRS (1:10 v/v) pada suhu 37 °C selama 48 jam secara anaerobik, ditompokkan ke atas agar BHI-TS dan diinkubasi lagi selama 48 jam. Diameter zon perencatan ditentukan secara mengukur zon yang tiada pertumbuhan *P. gingivalis* di sekeliling tompokan kultur sel *Lactiplantibacillus* sp. dan *Lactobacillus casei* strain Shiota (LcY) yang masing-masing digunakan sebagai kawalan positif dan negatif. Ujian ini dilakukan secara triplikasi untuk dua uji kaji yang tidak bersandar.

TEKNIK DIFUSI TELAGA AGAR

Aktiviti antibakteria menggunakan teknik difusi agar dilakukan secara menyebarkan kultur sel piawai *P. gingivalis* (OD 600 nm = 0.9) (Tsou et al. 2019) pada agar BHI-TS. Manakala setiap strain *Lactiplantibacillus* sp. (SUK1, SUK2 dan SUK3) diinkubasi dalam kaldu MRS masing-masing pada suhu 37 °C selama 48 jam secara anaerobik sehingga mencapai tahap kekeruhan piawai (OD 600 nm = 2.20). Selepas proses fermentasi tersebut, kaldu MRS tersebut dibahagi kepada tiga bahagian untuk proses penyediaan campuran kultur sel dan metabolit, supernatan tanpa sel steril (tidak neutral)

dan supernatan tanpa sel neutral steril. Supernatan tanpa sel steril disediakan secara menyingkirkan sel bakteria daripada supernatan melalui proses emparan pada 1000 r.p.m. pada suhu 4 °C selama 20 min diikuti dengan pensterilan menggunakan tiub picagari bermembran asetat selulosa berdiameter 0.22 µm (Bioflow, Malaysia). Manakala supernatan tanpa sel neutral steril disediakan secara meneutralkan supernatan dengan NaOH 1N dan disterilkan. Sebanyak 100 µL kultur sel *Lactiplantibacillus* sp., supernatan tanpa sel steril dan supernatan tanpa sel neutral steril diisi ke dalam telaga ujian (berdiameter 6 mm) masing-masing pada plat agar yang mengandungi sebaran *P. gingivalis*. Selepas 48 jam inkubasi, diameter zon perencatan diperhatikan dengan melihat zon yang tiada pertumbuhan *P. gingivalis* pada keliling telaga. *Lactobacillus casei* strain Shirota (LcY) dan kaldu MRS steril masing-masing digunakan sebagai kawalan positif dan negatif. Ujian ini dilakukan secara triplikat untuk dua uji kaji tidak bersandar.

Pemekatan protein dalam supernatan tanpa sel (tidak neutral) menggunakan tiub penuras membran pemekat protein Vivaspin bersaiz 10 kDa dan diemparkan (4000 x g, 10 min, 4 °C) juga dilakukan dan ditentukan aktiviti antibakteria produk tersebut terhadap *P. gingivalis* secara teknik difusi telaga agar. Klorheksidin glukonat (0.12%) dan kaldu MRS steril masing-masing digunakan sebagai kawalan positif dan negatif sebagai perbandingan dengan sampel ujian.

PEMENDAKAN SULFAT AMMONIA

Lactiplantibacillus sp. SUK1 menunjukkan aktiviti antibakteria paling tinggi terhadap *P. gingivalis* dan produk bakteriosin atau BLIS dalam supernatan tanpa sel (tidak neutral) yang dipekatkan berupaya merencat pertumbuhan *P. gingivalis*. Justeru, produk protein bakteriosin daripada strain SUK1 dipilih untuk dituliskan melalui proses pemendakan sulfat ammonia. Penulenan bakteriosin separa tulen ini dilakukan secara menumbuhkan *Lactiplantibacillus* sp. strain SUK 1 dalam kaldu MRS (1:10 v/v) pada suhu 37 °C selama 48 jam dan sel bakteria diasingkan secara emparan (10 000 r.p.m., 4 °C, 20 min). Supernatan tanpa sel dineutral (pH 6.5; NaOH 1N) dan disterilkan dengan penuras picagari bermembran asetat selulosa (0.22 µm i.d). Supernatan tanpa sel neutral steril tersebut kemudiannya dicampurkan dengan 80% sulfat ammonia, dikacau selama 4-6 jam dan disimpan pada suhu 4 °C. Pada hari

berikutnya, hasil larutan tersebut dimasukkan dalam tiub dialisis selulosa membran dengan berat molekul-cut off (MWCO) 12 000 – 14 000 Dalton dan didialisis selama 48 jam pada 4 °C sambil dikacau dengan pengacau magnet. Larutan PBS ditukar setiap 48 jam dan larutan dalam membran dialisis disimpan dalam tiub appendoff (Goh & Philip 2015) untuk kajian lanjut.

PENENTUAN KEPEKATAN PERENCATAN MINIMUM (MIC)

Aktiviti antibakteria produk bakteriosin separa tulen yang terhasil daripada proses pemendakan sulfat ammonia (80%) ditentukan secara ujian kepekatan perencatan minimum (MIC) berdasarkan kaedah kaldu pencairan-mikro protokol piawai (CLSI 2012) dan pengubahsuaian kaedah Shafiei et al. (2020) menggunakan plat 96-telaga. *P. gingivalis* yang diinkubasi dalam kaldu BHI-TS selama 48 jam, 37 °C dalam keadaan anaerobik, diapiawaikan (OD600 nm = 1.0) bersamaan 1×10^9 CFU/mL (Tsou et al. 2019) dan dicairkan kepada 1×10^6 CFU/mL dan dijadikan sebagai penunjuk bakteria. Kepekatan bakteriosin separa tulen yang digunakan diukur menggunakan Nanodrop pada OD 280 = 0.125 mg/mL dan dianggap 100% kepekatan. Sebanyak 50 µl bakteriosin separa tulen (berkepekatan 0.125 mg/mL atau 100% bakteriosin) dipipetkan pada telaga-pertama (T1) dan pencairan gandaan-dua dilakukan sehingga telaga-kesembilan (T9) menggunakan kaldu BHI-TS, diikuti penambahan kultur sel piawai *P. gingivalis* (50 µL) ke dalam setiap telaga ujian (T1-T9) dan telaga kawalan (T11-T12) secara triplikat (jalur A, B dan C) dalam plat microtiter 96-telaga dan diinkubasi secara anaerobik pada suhu 37 °C selama 48 jam. Kepekatan akhir produk bakteriosin adalah 50% - 0.2% atau 0.0625 - 0.00024 mg/mL (T1-T9). Kawalan kosong yang mengandungi kepekatan bakteriosin separa tulen (yang sama seperti T1-T9) tanpa sel bakteria juga disediakan (pada jalur E, F dan G) untuk menolak kekeruhan yang disebabkan oleh kepekatan protein. Klorheksidin glukonat (0.12%) (Oradex, Malaysia) yang berkesan merencat pertumbuhan *P. gingivalis* digunakan sebagai kawalan positif dan larutan penimbal-fosfat salin (PBS, pH7.4) (Bio Basic, Kanada) digunakan sebagai kawalan negatif (kaldu BHI-TS steril lebih sesuai digunakan dan akan membekalkan lebih nutrien untuk pertumbuhan *P. gingivalis* dalam telaga kawalan negatif). Selepas 48 jam, plat mikrotiter dibaca pada OD 600 nm. Purata dan sisihan piawai (SD) nilai OD direkodkan secara triplikat untuk dua uji kaji yang tidak bersandar.

Dengan menganggap pertumbuhan *P. gingivalis* pada kawalan negatif setelah ditolak dengan kawalan kosongnya ialah 100% pertumbuhan, pengiraan peratus pertumbuhan *P. gingivalis* pada sampel ujian adalah mengikut formula berikut:

$$\% \text{ Pertumbuhan} = \left[\frac{(\text{Nilai } OD_{600nm} \text{ telaga ujian} - \text{nilai } OD_{600nm} \text{ telaga kawalan 'blank'})}{(\text{Nilai } OD_{600nm} \text{ kawalan negatif} - \text{nilai } OD_{600nm} \text{ telaga kawalan 'blank'})} \right] \times 100$$

MBC tidak dapat ditentukan kerana terdapat kekeruhan dalam telaga-1 (50% protein akhir) yang menunjukkan berlaku pertumbuhan bakteria pada kepekatan protein yang tinggi.

PENGENALPASTIAN *Lactiplantibacillus* sp. SUK1

Penjujukan 16S rRNA

Dalam kajian ini, hanya *Lactiplantibacillus* sp. SUK1 yang paling berpotensi merencat pertumbuhan *P. gingivalis* dilakukan pencirian lanjut untuk penjujukan 16S rRNA. Koloni tulen pada agar MRS bersaiz kira-kira 5 mm³ (0.5 cm × 0.5 cm) dipotong dengan pisau steril dan disimpan di dalam tiub emparan mikro (1.5 mL). Pengekstrakan DNA menggunakan kit Bakteria Presto™Mini gDNA (Geneaid, GBB100) berdasarkan protokol pembekal telah dilakukan oleh Syarikat Apical Scientific Sdn. Bhd. Bakteria 16S rDNA dengan kepanjangan 1.5 kb diamplifikasi dengan menggunakan primer universal iaitu 27F (hadapan) (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') dan 1492R (berbalik) (5' GGTTACCITGTTACGACTT 3'). Jumlah isi padu tindak balas 25 µL mengandungi gDNA tulen yang telah dioptimum secara dalaman, 0.3 pmol setiap primer, deolsinukleosida trifosfat (dNTPs, 400 µM setiapnya), 0.5 U DNA polimerase tahan haba, penimbal PCR dan air. Kitaran analisis PCR dijalankan secara 1 kitaran pemisahan awal (94 °C selama 20 min), diikuti 25 kitaran (98 °C selama 10 saat; 53 °C selama 30 saat; 68 °C selama 1 min) untuk denarasi, penyepuhlindapan dan perluasan. Kemudian, produk 16S rDNA-PCR dituliskan dengan kaedah pembersihan PCR mengikut piawai, disusuli dengan penjujukan dwi-arah dengan primer universal 785F dan 907R menggunakan BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Data jujukan yang diperoleh dibandingkan

dengan dataset jujukan umum, Genbank, menggunakan program BLAST pada pengkalan data Pusat Informasi Bioteknologi Kebangsaan (NCBI) di laman web (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Jujukan yang menepati ≥ 98% jujukan dalam dataset dianggap spesies yang sama dengan spesies yang mempunyai skor persamaan tertinggi.

Produk PCR tulen ditentukan dengan elektroforesis gel menggunakan 1 µL produk PCR tulen (sampel ujian), penanda DNA (M) 1 KB bagi memastikan saiz jujukan yang betul, 1 ng plasmid tulen dengan kawasan selit 16S (kawalan positif) dan sampel tiada kawalan templat (NTC) sebagai kawalan negatif. Analisis gel elektroforesis dilakukan dalam medium agarosa TAE 1.0% w/v pada voltan 100V selama 60 minit.

HASIL KAJIAN DAN PERBINCANGAN

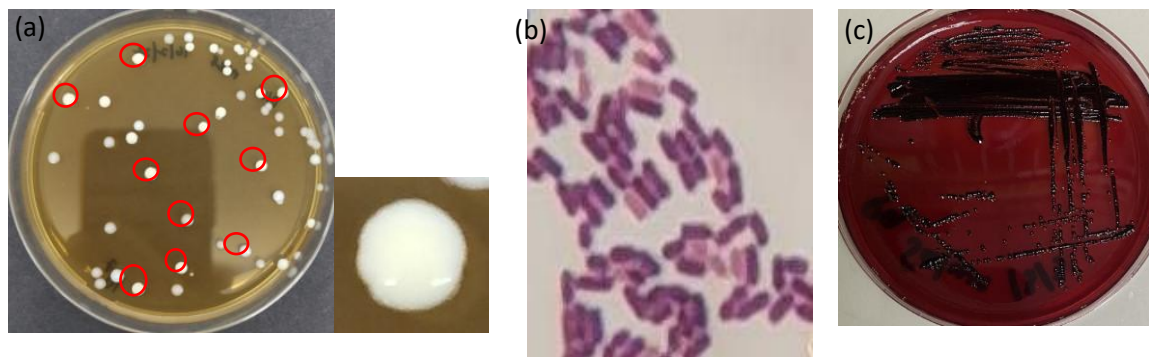
Pencilan bakteria probiotik daripada susu badan manusia dilakukan pada media selektif dengan sebanyak 10 koloni yang sama morfologi dikenal pasti, yang mempunyai ciri *Lactiplantibacillus* spp. dengan pewarnaan Gram-positif dan berbentuk bacillus, berbentuk bulat, warna putih kekuningan dan permukaan yang mukoid pada agar MRS serta menghasilkan keputusan negatif untuk ujian katalase dan oksidase (Huang et al. 2018; Siegrist 2018) (Rajah 1(a) & 1(b)). Sebanyak tiga koloni daripadanya telah dipilih secara rawak, dikelaskan sebagai *Lactiplantibacillus* sp. strain SUK1, SUK2 dan SUK3 dan dikaji aktiviti antibakterianya terhadap *P. gingivalis*. Berdasarkan kajian oleh Murphy et al. (2017), *Lactiplantibacillus* spp. adalah antara spesies yang tergolong dalam genus teras dalam susu badan manusia. Rajah 1(a) menunjukkan koloni *Lactiplantibacillus* spp. mempunyai bilangan koloni sebanyak 6.03 (± 1.40) × 10⁹ CFU/mL. Manakala *P. gingivalis* iaitu agen penyebab utama penyakit periodontium, digunakan sebagai penunjuk bakteria dan koloninya berpigmen hitam pada agar darah (Rajah 1(c)).

Ujian antibakteria dilakukan untuk menguji kesan antagonis bakteria probiotik serta produk metabolitnya terhadap patogen (Shokryazdan et al. 2014) dengan menggunakan teknik *Spot Lawn*, telaga agar dan penentuan kepekatan perencatan minimum (MIC). Sebagai permulaan kajian, tiga strain *Lactiplantibacillus* spp. (SUK1, SUK2 dan SUK3) yang bermorfologi sama tersebut dikaji sama ada mempunyai aktiviti antibakteria yang sama atau tidak terhadap *P. gingivalis* menggunakan

ujian *Spot Lawn* dan difusi telaga agar. Hasil ujian *Spot Lawn* mendapati bahawa strain SUK1 (29.33 ± 1.16 mm), mempunyai diameter zon perencatan yang paling besar berbanding strain SUK2 (23.33 ± 5.67 mm) dan SUK3 (17.00 ± 1.00 mm). Manakala *Lactobacillus casei* strain Shirota, iaitu kawalan positif, didapati menghasilkan diameter zon perencatan (26.67 ± 1.53 mm) yang lebih rendah berbanding SUK1 (Jadual 1). Hasil ujian *Spot Lawn* membuktikan bahawa ketiga-tiga strain tersebut adalah strain *Lactiplantibacillus* spp. yang berbeza serta berupaya merencat *P. gingivalis* dengan keupayaan berbeza. Ini sekali gus mencadangkan bahawa komponen sel setiap strain serta hasil metabolitnya yang dirembes secara ekstrasel berupaya merencat pertumbuhan *P. gingivalis*, agen penyebab penyakit periodontium. Kenyataan ini disokong oleh dua kajian lepas bahawa probiotik *Lactobacillus* sp. menghasilkan bahan metabolit seperti asid organik, bakteriosin dan

hidrogen peroksida (Plaza-Diaz et al. 2019) yang dapat merencat pertumbuhan patogen (Messaoudi et al. 2013). *Lactiplantibacillus* sp. SUK1 menunjukkan diameter zon perencatan yang lebih besar berbanding kawalan positif. Kesan antimikrob yang kuat dilihat dengan zon perencatan yang besar dan mungkin disebabkan oleh penghasilan kepekatan metabolit antimikrob yang lebih tinggi.

Berdasarkan ujian difusi telaga agar bagi ketiga-tiga strain *Lactiplantibacillus* spp. (SUK1, SUK2 dan SUK3) terhadap *P. gingivalis* mendapati bahawa kultur sel strain SUK1 mempunyai diameter zon perencatan yang paling besar (51.33 ± 4.73 mm), diikuti oleh strain SUK2 (48.33 ± 6.43 mm) dan strain SUK3 (44.0 ± 5.29 mm). Walau bagaimanapun, diameter zon perencatan kawalan positif, *Lactobacillus casei* strain Shirota adalah lebih besar iaitu 53.0 ± 2.65 mm (Jadual 1).



RAJAH 1. Morfologi (a) *Lactiplantibacillus* spp. pencilan sampel susu badan manusia pada plat agar MRS (pencairan 10^{-7}), (b) pewarnaan Gramnya (mikroskop cahaya 100X pembesaran) dan (c) *P. gingivalis* pada agar darah mengandungi BHI-TS

JADUAL 1. Purata diameter zon perencatan kultur sel *Lactiplantibacillus* spp. terhadap *P. gingivalis* dengan teknik *Spot Lawn* dan difusi telaga agar

Bakteria	Diameter zon perencatan (purata \pm SD) (mm)	
	Teknik <i>Spot Lawn</i>	Teknik difusi telaga agar
<i>Lactiplantibacillus</i> sp. SUK1	29.33 ± 1.16	51.33 ± 4.73
<i>Lactiplantibacillus</i> sp. SUK2	23.33 ± 5.67	48.33 ± 6.43
<i>Lactiplantibacillus</i> sp. SUK3	17.00 ± 1.00	44.0 ± 5.29
<i>Lactobacillus casei</i> strain Shirota (Kawalan positif)	26.67 ± 1.53	53.0 ± 2.65
Kaldu steril MRS (Kawalan negatif)	0 ± 0	0 ± 0

Ujian dilakukan secara triplikasi untuk dua uji kaji secara tidak bersandar

Ini mungkin disebabkan *Lactobacillus casei* strain Shirota mempunyai potensi tinggi serta telah stabil dan tumbuh dengan cepat dalam media MRS manakala ketiga-tiga strain pencilan air susu ibu masih perlu beradaptasi dengan media MRS tersebut. Diameter zon perencatan yang terbentuk dalam ujian difusi telaga agar yang menggunakan kultur sel adalah lebih besar berbanding ujian *Spot Lawn*. Hal ini kerana kultur terdiri daripada sel bakteria dan produk metabolit yang dapat meningkatkan aktiviti perencatan manakala ujian *Spot Lawn* hanya mengandungi sel bakteria. Selain itu, isi padu yang digunakan juga berbeza dengan 3 μL untuk ujian *Spot Lawn* manakala sebanyak 100 μL untuk ujian difusi telaga agar. Kenyataan ini disokong oleh kajian lepas daripada Rahimifard, Moghni dan Naseri (2016) yang mendapati bahawa difusi telaga agar menunjukkan zon perencatan yang lebih besar berbanding ujian *Spot Lawn*.

Mekanisme perencatan berlaku berikutan penghasilan agen antimikrob atau bakteriosin yang dapat meresap masuk ke dalam agar dan dapat merencat pertumbuhan patogen. Saiz zon diameter perencatan adalah berkadar langsung dengan jumlah dan aktiviti biologi bakteriosin yang dihasilkan (Gönczi et al. 2021).

Ujian supernatan tanpa sel bagi ketiga-tiga strain *Lactiplantibacillus* spp. SUK1, SUK2 dan SUK3 tidak menunjukkan sebarang aktiviti perencatan (Jadual 2). Ini berlaku kerana rawatan seperti teknik emparan dan penurasan dengan membran berdiameter 0.22 μm yang dilakukan ke atas supernatan tanpa sel ketiga-tiga strain *Lactiplantibacillus* spp. tersebut telah menyebabkan metabolit aktif serta asid organik yang dihasilkan berkurangan dan tidak mencukupi untuk merencat pertumbuhan *P. gingivalis*. Ini disokong dengan kajian oleh Tharmaraj dan Shah (2009). Justeru, pemekatan protein menggunakan membran selulosa Vivaspin perlu dilakukan bagi mengumpul produk bakteriosin mentah yang mencukupi untuk membuktikan terdapat aktiviti antibakteria. Terdapat juga beberapa faktor lain yang menyebabkan produk bakteriosin mentah dalam supernatan tanpa sel tidak aktif iaitu bakteriosin mungkin berkesan terhadap patogen tertentu, terhasilnya mekanisme koresistans, terdapat enzim nuklease dan protease yang mendegradasi bakteriosin dan juga faktor persekitaran seperti pH dan suhu (Heilbronner et al. 2021; Simons Alhanout & Duval 2020).

Keadaan ini berbeza dengan kawalan positif iaitu supernatan tanpa sel daripada kultur *Lactobacillus casei* strain Shirota berupaya merencat pertumbuhan

P. gingivalis dengan diameter zon perencatan sebesar 14.0 ± 1.0 mm dengan diameter zon perencatan yang terhasil menunjukkan produk metabolitnya terhasil dengan lebih cepat dan lebih berkesan berbanding produk metabolit *Lactiplantibacillus* spp. SUK1, SUK2 dan SUK3. Berdasarkan pemerhatian kajian juga didapati kekeruhan sel kultur bakteria kawalan positif adalah lebih tinggi berbanding bakteria ujian, iaitu *Lactiplantibacillus* spp. SUK1, SUK2 dan SUK3 walaupun kesemuanya diinkubasi selama 48 jam dalam keadaan yang sama. Ini berkemungkinan kerana *Lactobacillus casei* strain Shirota mempunyai fasa pertumbuhan yang lebih cepat berbanding fasa pertumbuhan *Lactiplantibacillus* spp. strain SUK1, SUK2 dan SUK3. Kenyataan ini disokong oleh kajian lepas yang menunjukkan bahawa produk metabolit aktif seperti bakteriosin dihasilkan pada fasa pertumbuhan eksponen sehingga pada permulaan fasa statik dan meningkat pada fasa statik pertumbuhan bakteria (Zangeneh, Khorrami & Khaleghi 2020). Ini disokong oleh Kumar et al. (2016) iaitu penghasilan bakteriosin oleh *Lactobacillus plantarum* bermula pada fasa eksponen dan mencapai maksimum pada permulaan fasa statik. Oleh itu, dalam kajian ini, pertumbuhan strain SUK1 selama 48 jam ditetapkan (piawai) iaitu pada OD 600 nm = 2.20 dengan bakteria mencapai fasa awal pertumbuhan statik dengan menganggap penghasilan produk bakteriosin telah maksimum dan sampel kajian pada piawai atau permulaan fasa statik tersebut diambil untuk ujian seterusnya. Penentuan pertumbuhan setiap strain ujian tidak dilakukan, tetapi penentuan pertumbuhan secara rawak pada salah satu strain dilakukan pada permulaan kajian dan mendapati pertumbuhan selama 48 jam, strain tersebut mencapai fasa awal statik (tidak dilaporkan). Manakala Gaspar et al. (2018) melaporkan penurunan dalam penghasilan bakteriosin pada fasa statik pertumbuhan bakteria kerana tiada pertumbuhan bakteria berlaku dan produk bakteriosin tidak dihasilkan.

Dilihat bahawa ujian telaga agar yang menggunakan kultur sel mempunyai zon perencatan yang besar (Jadual 1) tetapi tiada aktiviti pada ujian yang menggunakan supernatan tanpa sel (Jadual 2). Kajian oleh Wasfi et al. (2018) juga mendapati bahawa zon perencatan yang dihasilkan oleh kultur sel bakteria adalah lebih besar berbanding supernatan tanpa sel yang disediakan pada kepekatan sel yang sama. Zon perencatan yang besar terhasil disebabkan oleh kehadiran komponen struktur sel *Lactiplantibacillus* sp. yang aktif secara metabolik serta produk metabolitnya (dikenali sebagai postbiotik)

yang dirembes secara ekstrasel berupaya merencat sel patogen yang dikaji. Sel dalam kultur bakteria boleh menghasilkan agen antimikrob yang aktif sebagai tindak balas kepada rangsangan atau bertahan untuk hidup dalam keadaan kekurangan nutrien dalam media (Oldak et al. 2017).

Manakala supernatan tanpa sel *Lactiplantibacillus* sp. strain SUK1, SUK2 dan SUK3 yang neutral tidak menunjukkan sebarang aktiviti perencatan (Jadual 2). Ini kerana supernatan tanpa sel neutral tersebut tidak mempunyai produk antimikrob/metabolit aktif yang mencukupi serta produk asid laktik yang dihasilkan tidak berupaya merencat pertumbuhan *P. gingivalis*. Bagi kawalan positif, supernatan tanpa sel neutral (22.67 ± 2.52 mm) memberi zon perencatan lebih besar berbanding supernatan tanpa sel yang tidak dineutralkan (14.0 ± 1.0 mm). Ini mungkin disebabkan oleh aktiviti produk metabolitnya seperti bakteriosin dan hidrogen peroksida adalah aktif dalam keadaan neutral dan kehadiran asid dalam supernatan tidak menyumbang kepada aktiviti antibakteria. Kenyataan ini berbeza dengan kajian Tharmaraj dan Shah (2009) yang menggunakan kultur sel, supernatan tanpa sel neutral dan tidak neutral yang disterilkan dan mereka berpendapat bahawa zon perencatan tidak terbentuk adalah disebabkan oleh produk metabolit LAB seperti bakteriosin, asid laktik atau kumpulan asid organik lain adalah tidak aktif pada pH 7. Dalam kajian ini, dilihat bahawa komponen metabolit yang terhasil

adalah tidak mencukupi dan kemungkinan supernatan tersebut menjadi cair akibat penambahan NaOH 1 N semasa proses penutralan supernatan. Oleh itu, untuk mendapatkan aktiviti perencatan yang ketara, bakteriosin tersebut perlu ada pada kepekatan yang tinggi dengan menggunakan teknik pemendakan bakteriosin (Burianek & Yousef 2000). Teknik pemekatan protein menggunakan penuras membran selulosa Vivaspin dan pengeringan supernatan tanpa sel dapat membantu memekatkan protein mentah bakteriosin.

Kajian lanjut dilakukan ke atas *Lactiplantibacillus* sp. SUK1 menggunakan supernatan tanpa sel yang dipekatkan menggunakan Vivaspin iaitu tiub membran bersaiz 10 kDa. Penggunaan Vivaspin menyebabkan supernatan tanpa sel *Lactiplantibacillus* sp. SUK1 berupaya merencat pertumbuhan *P. gingivalis* pada kepekatan tertentu dengan diameter zon perencatan 13.0 ± 0.07 mm menggunakan ujian difusi telaga agar (Jadual 2). Supernatan tersebut mengandungi bakteriosin dan sebatian antimikrob lain yang dihasilkan oleh *Lactobacilli*, dikenali sebagai postbiotik dan pernyataan tersebut juga disokong oleh kajian Köll-Klais, Mändar dan Leibur (2005). Chen et al. (2012) juga melaporkan bahawa supernatan tanpa sel *Lactobacillus fermentum* dan *Lactobacillus salivarius* berupaya merencat pertumbuhan *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* (nama baru: *Streptococcus sanguinis*) dan *P. gingivalis*.

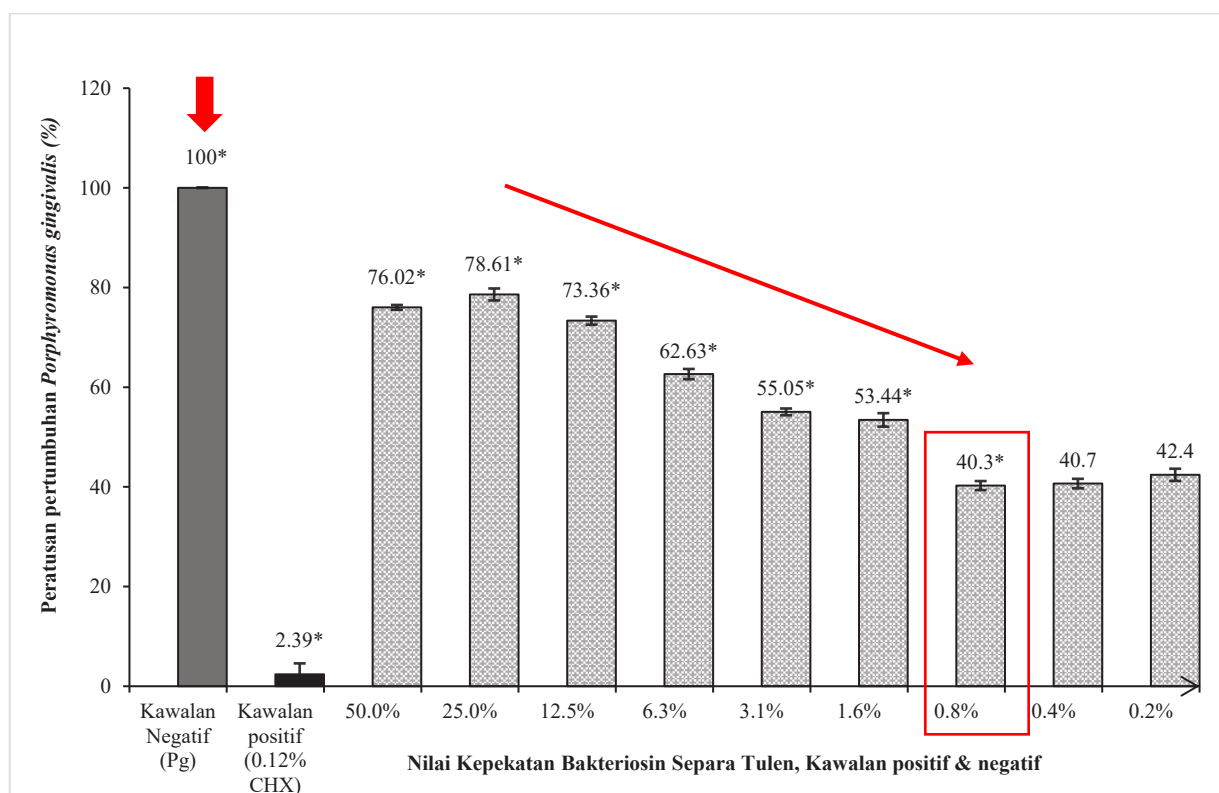
JADUAL 2. Purata diameter zon perencatan bagi supernatan tanpa sel, supernatan tanpa sel neutral dan supernatan tanpa sel yang dipekatkan terhadap *P. gingivalis* dengan teknik difusi telaga agar

Bakteria	Diameter zon perencatan (purata \pm SD) (mm)		
	Supernatan tanpa sel (tidak neutral)	Supernatan tanpa sel neutral	Supernatan tanpa sel (tidak neutral) yang dipekatkan
<i>Lactiplantibacillus</i> sp. SUK1	0	0	13.0 ± 0.07
<i>Lactiplantibacillus</i> sp. SUK2	0	0	-
<i>Lactiplantibacillus</i> sp. SUK3	0	0	-
<i>Lactobacillus casei</i> strain Shirota (kawalan positif)	14.0 ± 1.0	22.67 ± 2.52	-
0.12% Klorheksidin (kawalan positif)	-	-	35.0 ± 0.40
Kaldu steril MRS (kawalan negatif)	0	0	0

Ujian dilakukan secara triplikasi untuk dua uji kaji secara tidak bersandar. (-) tidak dilakukan

Penulenan produk bakteriosin separa tulen dilakukan dengan kaedah pemendakan sulfat ammonia berkepekatan 80%. Aktiviti antibakteria produk bakteriosin separa tulen ini terhadap *P. gingivalis* dikaji dengan kaedah kaldu pencairan mikro bagi menentukan kepekatan perencatan minimum (MIC) produk tersebut. Dengan menganggap pertumbuhan *P. gingivalis* pada telaga kawalan negatif adalah 100%, peratus pertumbuhan *P. gingivalis* pada telaga ujian dapat ditentukan dengan menghitung nilai kekeruhan telaga ujian yang terhasil pada OD 600 nm setelah menolak OD telaga ujian dengan OD telaga kawalan blank. Hasil kajian menunjukkan terdapat pengurangan pertumbuhan *P. gingivalis* bermula pada kepekatan 50% hingga 0.8% dan stabil sehingga 0.2% berbanding kawalan negatif. Perencatan tertinggi bagi bakteriosin separa tulen terhadap *P. gingivalis* berlaku pada kepekatan akhir bakteriosin separa tulen

0.8%, iaitu dengan mengekalkan peratusan terendah pertumbuhan *P. gingivalis* (40.3%) berbanding pada kepekatan yang lain (Rajah 2). Kepekatan protein awal dalam bakteriosin separa tulen adalah 0.125 mg/ml (dan dianggap kepekatan 100%) digunakan untuk menentukan aktiviti antibakterianya dan didapati kepekatan protein bakteriosin separa tulen yang rendah diperlukan untuk merencat pertumbuhan *P. gingivalis*, iaitu (0.0625 - 0.00024 mg/mL) dengan 78-40% perencatan. Walaupun pemendakan sulfat ammonia sering digunakan untuk menulenan bakteriosin, namun kaedah ini masih mempunyai kelemahan iaitu bentuk pepejal pelet yang tidak lengkap, kepekatan sulfat ammonia yang tinggi semasa fermentasi pelet dan protokol yang telah diterbitkan tanpa piawaian ketepuan sulfat ammonia yang jelas (Burgess & Deutscher 2009). Disebabkan oleh berat molekul yang rendah, sesetengah bakteriosin tidak mendak walaupun pada kepekatan

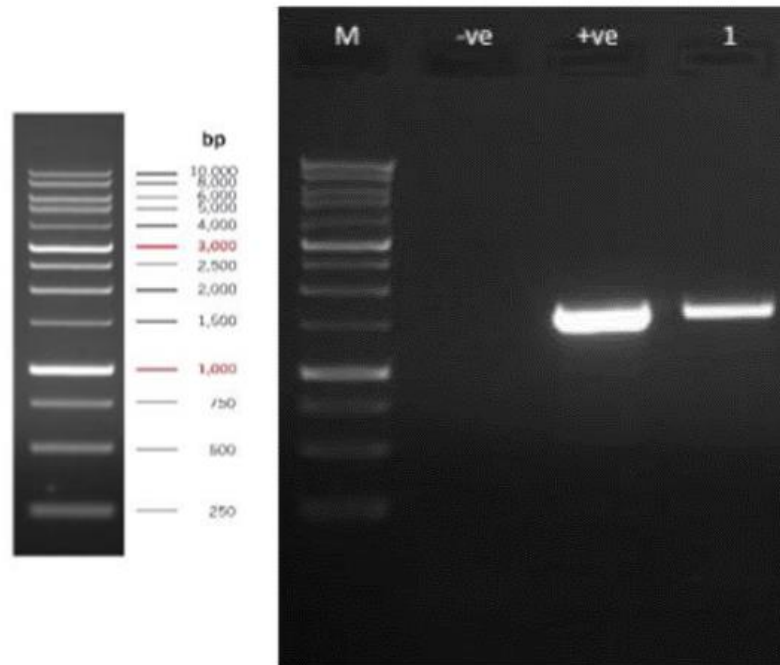


RAJAH 2. Peratusan pertumbuhan *P. gingivalis* pada kepekatan bakteriosin separa tulen berbeza dengan menganggap kawalan negatif sebagai 100% pertumbuhan *P. gingivalis*. Hasil signifikan jika $*P < 0.05$ dibandingkan antara kawalan negatif (PBS), kawalan positif (CHX) and bakteriosin separa tulen pada (50 – 0.2%) terhadap *P. gingivalis*

sulfat ammonia yang tinggi seperti 75-80% (Borzenkov, Surovtsev & Dyatlov 2014). Kehilangan bakteriosin berat molekul rendah boleh juga berlaku melalui proses membran dialisis semasa proses pemendakan (Tiwari & Srivastava 2008).

Pengenalpastian koloni tulen *Lactiplantibacillus* sp. SUK1 yang berpotensi dilakukan oleh pihak Apical Scientific Sdn. Bhd. bagi tujuan penjujukan 16S rRNA. Produk PCR menghasilkan satu jalur dengan saiz yang sama dengan primer tulen dengan 16S rRNA genes (*purified plasmid 16S region insert* sebagai kawalan positif) dengan saiz aplikon 1500-2000 bp, mengesahkan kehadiran gen strain SUK1 dalam sampel bakteria yang dikaji (Rajah 3). Jujukan gen 16S rRNA yang diperolehi dibandingkan dengan jujukan 16S rRNA yang diketahui daripada pangkalan data Pusat Informasi Bioteknologi Kebangsaan (NCBI).

Beberapa mikroorganismenya dari GenBank diberikan bersama-sama penutup kueri (%) dan peratusan pengenalpastian (%). Urutan gen 16S rRNA yang hampir lengkap ditentukan untuk *Lactiplantibacillus* strain SUK1. Urutan ini berfungsi untuk membezakannya daripada *Lactiplantibacillus* lain dengan menunjukkan perbezaan peratusan persamaannya. *Lactiplantibacillus* sp. strain SUK1 dikenal pasti sebagai *Lactiplantibacillus pentosus* strain 124-2 dengan nilai persamaan 99.87% (Jadual 3). *Lactiplantibacillus pentosus* strain 124-2 dipilih kerana bakterianya dipencilkan daripada makanan yang difermentasi dan sifat bakteria asid laktik (LAB) (Yuliana et al. 2023) yang sama dengan *Lactiplantibacillus* strain SUK 1. Manakala *Lactiplantibacillus paraplantarum* DSM 10667 dipencilkan daripada bir yang tercemar dan tidak menunjukkan sifat LAB (Parte et al. 2020; Zheng et al. 2020).



M: 1KB DNA Ladder; **-ve:** No template control; **+ve:** Purified Plasmid with 16S region insert, 1ng; **1:** PCR product *Lactiplantibacillus* sp. SUK1

RAJAH 3. Gel elektroforesis produk PCR tulen *Lactiplantibacillus* strain SUK 1

JADUAL 3. Senarai mikroorganisme GenBank yang mempunyai persamaan dengan *Lactiplantibacillus* sp. SUK1

Mikroorganisme Genbank	Penutup kueri (%)	Peratusan pengenalpastian (%)
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> strain 124-2	99	99.87
<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i> strain DSM 10667	99	99.80
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain JCM 1149	99	99.73
<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i> strain DKO 22	99	99.13
<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i> strain LMG 24284	99	99.00

KESIMPULAN

Daripada kajian ini dapat disimpulkan bahawa aktiviti perencatan terhadap *P. gingivalis* adalah disebabkan oleh komponen sel *Lactiplantibacillus* sp. dan produk metabolit yang dirembesnya secara ekstrasel. Walaupun nilai kepekatan perencatan minimum (MIC) tidak dapat ditentukan bagi bakteriosin separa tulen, namun terdapat perencatan ketara pada pertumbuhan *P. gingivalis* dalam kepekatan protein bakteriosin separa tulen 50% dan kekal rendah sehingga kepekatan 0.2%. Justeru, kajian ini cukup membuktikan *Lactiplantibacillus* sp. SUK1, pencilan susu ibu berpotensi untuk digabungkan dalam produk prebiotik atau produk susu formula dan produk penjagaan oral bagi kegunaan bayi atau/dan orang dewasa, berikutan produk probiotik pencilan susu ibu ini adalah selamat kepada bayi maka ia sesuai digunakan kepada semua peringkat umur manusia. Kajian lanjut perlu dilakukan bagi mengenal pasti tindak balas lanjut strain bakteria ini sama ada secara sel tunggal dan campuran beberapa strain berbeza bagi melihat aktiviti perencatan yang berlaku untuk menilai keberkesannya dalam pencegahan penyakit dan mengekalkan kesihatan manusia.

PENGHARGAAN

Penyelidikan ini dibiayai oleh Geran Galakan Penyelidik Muda, Universiti Kebangsaan Malaysia dengan kod geran GGPM-2021-019 yang dianugerahkan kepada Dr. Zaleha Shafie sebagai penyelidik utama. Setinggi-tinggi penghargaan kepada Fakulti Pergigian dan Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia atas kerjasama yang diberikan dalam menjayakan penyelidikan ini.

RUJUKAN

- Ahn, K.B., Baik, J.E., Park, O.J., Yun, C.H. & Han, S.H. 2018. *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PLoS ONE* 13: e0192694.
- Balagopal, S. & Arjunker, R. 2013. Chlorhexidine: The gold standard antiplaque agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 5(12): 270-274.
- Ballard, O. & Morrow, A.L. 2013. Human milk composition, nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America* 60(1): 49-74.
- Bengtsson, T., Zhang, B., Selegard, R., Wiman, E., Aili, D. & Khalaf, H. 2017. Dual action of bacteriocin PLNC8 $\alpha\beta$ through inhibition of *P. gingivalis* infection and promotion of cell proliferation. *Pathogens and Disease* 75: ftx064.
- Borzenkov, V., Surovtsev, V. & Dyatlov, I. 2014. Obtaining bacteriocins by chromatographic methods. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 05(05): 446-451.
- Bostanci, N. & Belibasakis, G.N. 2012. *Porphyromonas gingivalis*: An invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiology Letters* 333(1): 1-9.
- Burgess, R.R. & Deutscher, M. 2009. *Protein Precipitation Techniques. Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*. 2nd ed. USA: Elsevier.
- Burianek, L.L. & Yousef, A.E. 2000. Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Letters in Applied Microbiology* 31: 193-197.
- Chen, L.J., Tsai, H.T., Chen, W.J., Hsieh, C.Y., Wang, P.C., Chen, C.S., Wang, L. & Yang, C.C. 2012. *In vitro* antagonistic growth effects of *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus salivarius* and their fermentative broth on periodontal pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology* 43(4): 1376-1384.
- CLSI. 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grows Aerobically*. Approved Standard, 9th ed. CLSI Document M07- A9, USA.

- Gaspar, C., Donders, G., Palmeira-De-Oliveira, R., Queiroz, J., Tomaz, C., Martinez-De-Oliveira, J. & Palmeira-De-Oliveira, A. 2018. Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *AMB Express* 8(1): 1-8.
- Goh, H.F. & Philip, K. 2015. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Weissella confusa* A3 of dairy origin. *PLoS ONE* 10(10): e0140434.
- Gönczi, N.N., Strang, O., Bagi, Z., Rákhely, G. & Kovács, K. 2021. Interactions between probiotic and oral pathogenic strains. *Biologia Futura* 72(4): 461-471.
- Grazia, S.E., Sumayyah, S., Haiti, F.S., Sahlan, M., Heng, N.C.K. & Malik, A. 2017. Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) activity of *Streptococcus macedonicus* MBF10-2 and its synergistic action in combination with antibiotics. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 10(12): 1140-1145.
- Heilbronner, S., Krismer, B., Brötz-Oesterhelt, H. & Peschel, A. 2021. The microbiome-shaping roles of bacteriocins. *Nature Review of Microbiology* 19(11): 726-739.
- Huang, C.H., Li, S.W., Huang, L. & Watanabe, K. 2018. Identification and classification for the *Lactobacillus casei* group. *Frontiers in Microbiology* 9(1974): 1-13.
- Jamalifar, H., Rahimi, H., Samadi, N., Shahverdi, A., Sharifian, Z. & Hosseini F. 2011. Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi-drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran Journal of Microbiology* 3(1): 21-25.
- Kang, M.S., Lim, H.S., Oh, J.S., Lim, Y.J., Wuertz-Kozak, K. & Harro, J.M. 2017. Antimicrobial activity of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus*. *Pathogens and Disease* 75(2): 1-13.
- Köll-Klais, P., Mändar, R. & Leibur, E. 2005. Oral Lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: Species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiology and Immunology* 20: 354-361.
- Kumar, V., Sheoran, P., Gupta, A., Yadav, J.P. & Tiwari, S. 2016. Antibacterial property of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LD4 isolated from a fermented food. *Annals of Microbiology* 66: 1431-1440.
- Lopetuso, L.R., Giorgio, M.E., Saviano, A., Scaldaferrri, F., Gasbarrini, A. & Cammarota, G. 2019. Bacteriocins and bacteriophages: Therapeutic weapons for gastrointestinal diseases? *International Journal of Molecular Sciences* 20(1): 183.
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L. & Rodríguez, J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics* 143(6): 754-758.
- McFarland, L.V. 2015. Probiotics for the primary and secondary prevention of *C. difficile* infections: A meta-analysis and systematic review. *Antibiotics* 4(2): 160-178.
- Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J.M. & Dousset, X. 2013. *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology* 36(2): 296-304.
- Mirnejad, R., Vahdati, A.R., Rashidani, J., Erfani, M. & Piranfar, V. 2013. The antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* culture supernatant against multiple drug-resistant clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* in vitro. *Iran Red Crescent Medical Journal* 15(2): 122-126.
- Murphy, K., Curley, D.T., O'Callaghan, T.F., O'Shea, C.A., Dempsey, E.M., O'Toole, P.W., Ross, R.P., Ryan, C.A. & Stanton, C. 2017. The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. *Scientific Reports* 7: 1-10.
- Óldak, A., Zielińska, D., Rzepkowska, A. & Kołozyn-Krajewska, D. 2017. Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski cheese. *BioMed Research International* 2017: 6820369.
- Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J., Reimer, L.C. & Göker, M. 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70: 5607-5612.
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F.J., Gil-Campos, M. & Gil, A. 2019. Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition* 10(1): S49-S66.
- Rahimifard, N., Moghni, M. & Naseri, M. 2016. Evaluation and comparison of three antimicrobial activity methods using *Bifidobacteria bifidum* and *Bifidobacteria infantis* as probiotic bacteria against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Journal of Bacteriology and Mycology* 2(3): 61-64.
- Shafiei, Z., Rahim, Z.H.A., Philip, K., Thurairajah, N. & Yaacob, H. 2020. Potential effects of *Psidium* sp., *Mangifera* sp., *Mentha* sp. and its mixture (PEM) in reducing bacterial populations in biofilms, adherence and acid production of *S. sanguinis* and *S. mutans*. *Archives of Oral Biology* 109: 104554.
- Shokryazdan, P., Sico, C.C., Kalavathy, R., Liang, J.B., Alitheen, N.B., Faseleh Jahromi, M. & Ho, Y.W. 2014. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed Research International* 2014: 927268.
- Siegrist, J. 2018. Streptococci - Overview of detection, identification, differentiation and cultivation techniques. *AnalytiX* 7: 3.
- Simons, A., Alhanout, K. & Duval, R.E. 2020. Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms* 8(5): 639.

- Tharmaraj, N. & Shah, N.P. 2009. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. *International Food Research Journal* 16(1): 261-276.
- Tsou, S.H., Hu, S.W., Yang, J.J., Yan, M. & Lin, Y.Y. 2019. Potential oral health care agent from coffee against virulence factor of periodontitis. *Nutrients* 11(9): 2222-2235.
- Tiwari, S.K. & Srivastava, S. 2008. Purification and characterization of Plantaricin LR14: A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79(5): 759-767.
- Wasfi, R., Abd El-Rahman, O.A., Zafer, M.M. & Ashour, H.M. 2018. Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *Journal of Cellular Molecular Medicine* 22(3): 1972-1983.
- World Health Organization (WHO). 2014. *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*. Switzerland: WHO Press.
- Yuliana, T., Pratiwi, A.R., Zahratunnisa, S., Rialita, T., Cahyana, Y., Harlina, P.W. & Marta, H. 2023. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 124-2 isolated from dadih. *Applied Sciences (Switzerland)* 13(7): 1-11.
- Zangeneh, M., Khorrami, S. & Khaleghi, M. 2020. Bacteriostatic activity and partial characterization of the bacteriocin produced by *L. plantarum* sp. isolated from traditional sourdough. *Food Science Nutrition* 8(11): 6023-6030.
- Zhang, Y., Ding, Y. & Guo, Q. 2022. Probiotic species in the management of periodontal diseases: An overview. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12: 1-15.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G. & Lebeer, S. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(4): 2782-2858.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: noraziah.zin@ukm.edu.my