

Ketahanan Bakteri Asam Laktat (BAL) Isolat 9A Hasil Isolasi dari Kolon Sapi Bali terhadap pH Rendah dan Natrium Deoksikolat (NaDC)

(RESISTENCE TEST OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATES 9A FROM BALI CATTLE COLON AGAINST LOW pH AND SODIUM DEOXYCHOLATE (NaDC))

Andri Nurdiana Febrianti¹, I Wayan Suardana², I Nyoman Suarsana³

¹Mahasiswa Pendidikan Profesi Dokter Hewan,
²Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner,
³Laboratorium Biokimia Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,
Jln. PB. Sudirman, Denpasar, Bali;
Tlp. (0361) 223791, Faks. (0361) 701808.
E-mail: andri_nurdiana19@yahoo.co.id

ABSTRAK

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu kelompok bakteri probiotik, yang dapat memberikan dampak positif terhadap kesehatan manusia dan hewan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi bakteri asam laktat isolat 9A yang merupakan hasil isolasi dari kolon sapi Bali sebagai kandidat probiotik yang memiliki ketahanan terhadap pH rendah dan Natrium Deoksikolat (NaDC). Penelitian dilakukan melalui beberapa tahap yakni tahap pertama diawali dengan uji kultivasi yang bertujuan untuk memastikan isolat tidak terkontaminasi mikroorganisme selain bakteri asam laktat, yang meliputi uji pertumbuhan pada media MRS cair, uji katalase, dan pewarnaan Gram. Tahap kedua meliputi pengujian ketahanan isolat 9A terhadap pH rendah (pH 2, 3, dan 4) dan uji NaDC dengan konsentrasi 0,2 mM, 0,4 mM dan 0,6 mM. Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat 9A memiliki sifat dapat tumbuh baik pada media MRS cair dengan suasana anaerob, uji katalase negatif, dan termasuk bakteri Gram positif. Pada uji ketahanan terhadap pH rendah dan NaDC, isolat 9A memiliki daya tumbuh pada media dengan pH 2 dan NaDC dengan konsentrasi sampai 0,6 mM. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat 9A memiliki ketahanan terhadap pH rendah dan NaDC, yang merupakan syarat utama dari probiotik.

Kata kunci : Bakteri asam laktat, probiotik, pH rendah, Natrium Deoksikolat, isolat BAL 9A, kolon sapi Bali.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are one of group probiotic bacteria, which have a positive impact on human and animal health. The aim of this research was to determine the potency of lactic acid bacteria (LAB) isolate 9A, that isolated from the colon of Bali cattle as a probiotic candidate which have resistance to acid condition and Sodium Deoxycholate (NaDC). The study was started with the cultivation test that aims to make sure uncontaminated isolates of microorganisms, including test for growth response in MRS broth medium, test on catalase, and Gram stain. Its potency for probiotic development was tested by growing the isolate in MRS broth medium with low pH conditions (pH 2, 3 and 4) and in MRS medium supplemented with various concentration of NaDC (0.2 mM, 0.4 mM and 0.6 mM). The results showed that isolates 9A was able to grow well in MRS broth medium under anaerobic condition. In addition, it also showed catalase negative and Gram positive properties, indicating that this isolate was confirmed as an LAB isolate. In the main experiment, this isolate was

found to be resistant to low pH conditions (up to pH 2) and high concentration of NaDC (up to 0.6 mM). The result indicating this isolate has potential to be developed as a probiotic candidate.

Keywords: lactic acid bacteria, probiotic, low pH, Sodium Deoxycholate, LAB isolates 9A, Bali cattle colon.

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) adalah salah satu bakteri yang memiliki peran penting dalam menjaga keseimbangan ekosistem sistem pencernaan (Surono, 2004). Secara umum bakteri asam laktat tergolong bakteri gram positif, katalase negatif, tidak membentuk spora, tidak mempunyai *cytochrome*, aerotoleran, anaerobik hingga mikroaerofilik, membutuhkan nutrisi yang kompleks seperti asam-asam amino, vitamin (B₁, B₆, B₁₂, dan biotin), purin, pirimidin (Surono, 2004; Jeevaratman, 2005).

Sapi bali (*Bos sondaicus*) merupakan sapi potong asli pulau Bali yang memiliki keunggulan mampu beradaptasi dengan lingkungan yang kurang menguntungkan, dapat beradaptasi dengan jenis pakan yang sederhana dan memiliki daya cerna terhadap pakan dengan kandungan serat yang tinggi (Guntoro, 2002). Berhubungan dengan daya cernanya yang tinggi, mikroflora dalam saluran pencernaan memiliki peran penting dalam peningkatan pertumbuhan, produksi, dan kesehatan sapi bali. Menurut Hall dan Silver (2009) diperkirakan terdapat 10^{12} bakteri pada saluran pencernaan seekor ruminansia. Dari sekian banyak jumlah bakteri yang ada di saluran pencernaan tersebut, diperkirakan terdapat 500 species yang termasuk ke dalam kelompok bakteri asam laktat atau BAL (Gorbach, 2001).

Bakteri asam laktat dapat dikelompokkan sebagai bakteri probiotik (Surono, 2004). Probiotik merupakan salah satu alternatif pakan tambahan untuk ternak, yang dapat memberikan manfaat dalam meningkatkan kesehatan dan daya imunitas ternak, serta menurunkan populasi bakteri patogen yang ada dalam saluran pencernaan ternak (Ziemer dan Gibson, 1998). Penelitian mengenai bakteri asam laktat (BAL) sebagai probiotik telah dilakukan sebelumnya, oleh Suardana *et al.* (2009), yang menyebutkan jenis BAL genus *Lactobacillus* asal cairan rumen sapi bali merupakan kandidat unggul probiotik. Syarat-syarat yang harus dipenuhi BAL sebagai kandidat probiotik antara lain mampu bertahan dalam kondisi pH lambung yang rendah, tahan terhadap keasaman garam empedu, dan enzim-enzim pencernaan yang akan dilewati oleh bakteri probiotik selama perjalanannya menuju kolon. Umumnya, bakteri tumbuh optimal pada kondisi pH netral yakni 7,0. Namun biasanya spesies BAL lebih toleran terhadap kondisi lingkungan pH asam (FAO, 1998). Hal ini berkaitan dengan kondisi saluran pencernaan hewan yang tergolong memiliki kondisi dengan pH rendah atau asam. Seekor sapi atau ruminansia yang sehat, normalnya memiliki pH yang berbeda

sepanjang saluran pencernaannya, dimulai dari retikulo-rumen yang memiliki pH 5,3-6,5; abomasum pH 2,2-4,1; dan usus dengan pH 5,6-6,8 (Wheeler dan Noller, 1977). Berdasarkan pemaparan tersebut, maka dilakukan penelitian akan ketahanan BAL terhadap pH rendah dan NaDC, dimana uji ini merupakan prasyarat utama untuk menghasilkan BAL yang berpotensi sebagai kandidat bakteri probiotik.

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat 9A yang diisolasi dari kolon sapi bali dan telah disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C . Bahan-bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini meliputi media *de Man Regosa and Sharpe* (MRS) cair, H_2O_2 10 %, bahan pewarnaan Gram (kristal violet, *Lugol's iodine*, alkohol, safranin), NaOH 0,1 N, HCL, 0,85% NaCl, dan natrium deoksikolat (NaDC).

Isolat 9A diambil dari stok kuman yang disimpan pada suhu -20°C , kemudian ditumbuhkan pada media *de Man Regosa and Sharpe* (MRS) cair dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dalam suasana anaerob.

Isolat dari MRS cair diambil dengan menggunakan *ose*, disebarkan setipis mungkin di atas kaca objek, dikeringkan di atas api, diwarnai dengan larutan kristal violet 2% selama 60 detik, dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya ditetesi dengan sediaan *Lugol's iodine*, diamkan selama 60 detik, dicuci dengan air mengalir, ditetesi dengan alkohol 96% dan dibiarkan selama 60 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya diwarnai dengan pewarna tandingan safranin, dan diamkan selama 5 detik. Sediaan BAL yang telah terwarnai dicuci kembali dengan air mengalir, keringkan sediaan atau angin-anginkan sediaan. Selanjutnya pengamatan sel bakteri yang telah diwarnai di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali, terlebih dulu sediaan ditetesi minyak imersi (Liana *et al.*, 2013).

Uji katalase dilakukan pada cawan petri dengan meneteskan kultur isolat dari MRS cair, ditambah H_2O_2 10% sama banyak. Reaksi positif uji katalase ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung-gelembung yang berarti ada pembentukan gas oksigen (O_2) sebagai hasil pemecahan H_2O_2 oleh enzim katalase yang diproduksi oleh bakteri tersebut. Bakteri asam laktat memberikan hasil negatif pada uji ini, sehingga hasil reaksi uji katalase tidak terbentuk gelembung udara yang berarti tidak terbentuk gas oksigen (Romadhon *et al.*, 2012).

Isolat BAL yang telah melalui uji katalase dan pewarnaan gram, selanjutnya dilakukan uji ketahanannya terhadap pH rendah, yakni pH 2, 3, dan 4. Sebanyak 100 μL isolat BAL yang sebelumnya telah disuspensi dari stok kuman, dimasukkan ke dalam *ependorf tube*. Masing-

masing tabung tersebut telah berisi 900 μ L media MRS cair yang pH-nya telah disesuaikan (pH 2, 3, dan 4), lalu diinkubasikan dalam pemanas air suhu 37°C selama 3 jam. Selanjutnya, suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit dan supernatannya dibuang. Pelet bakteri yang diperoleh dicuci sebanyak dua kali menggunakan 300 μ L larutan salin dengan cara *divortex* dan disentrifugasi kembali. Kemudian pelet yang diperoleh selanjutnya disuspensikan, lalu sebanyak 50 μ L suspensi ini diinokulasikan ke dalam 5 ml media MRS cair dengan pH netral untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam suasana anaerob. Ketahanan BAL terhadap pH rendah ditunjukkan oleh pertumbuhan BAL yang diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm (OD 660 nm). Bila nilai absorbansinya (A) < 0,1 maka *strain* bakteri tersebut dianggap tidak tahan terhadap pH rendah, dan bila $A \geq 0,1$ maka *strain* BAL tahan terhadap pH rendah (Sujaya *et al.*, 2008).

Uji ketahanan BAL terhadap natrium deoksikolat (NaDC) dilakukan dengan membiakkan BAL isolat 9A dari stok kuman ke dalam 5 ml medium MRS cair dengan pH sebesar 7,2. Masing-masing sebanyak 50 μ L isolat yang ditumbuhkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 mL MRS cair dengan perlakuan masing-masing tabung antara lain kontrol (media MRS cair tidak ditambahkan natrium deoksikolat (NaDC)), perlakuan 1, 2, dan 3 masing-masing ditambahkan NaDC sebanyak 10, 20, dan 30 μ L, sehingga pada masing-masing perlakuan diperoleh konsentrasi akhir NaDC sebesar 0,2; 0,4; dan 0,6 mM. Selanjutnya semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam secara anaerob. Ketahanan isolat BAL diukur berdasarkan tingkat kekeruhan (OD 660 nm) menggunakan spektrofotometer. Bila nilai absorbansinya (A) < 0,1 maka *strain* bakteri tersebut dianggap tidak tahan terhadap NaDC, dan bila $A \geq 0,1$ maka *strain* BAL tahan terhadap NaDC (Sujaya *et al.*, 2008).

Seluruh data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dianalisis secara deskriptif kualitatif yang dapat disajikan dalam bentuk tabel atau grafik, yang merupakan hasil dari pengukuran *optical density* (OD) dari masing-masing uji yang dilakukan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji ketahanan BAL isolat 9A terhadap pH rendah menunjukkan bahwa isolat memiliki sifat tahan terhadap lingkungan dengan pH 2, 3, dan 4, meskipun terjadi penurunan laju pertumbuhan ketika dipaparkan pada pH yang lebih rendah (Tabel 1).

Tabel 1. Ketahanan Isolat BAL 9A terhadap pH rendah

Kode Isolat	Indikator Pertumbuhan BAL (<i>Optical Density</i> (OD) pada λ 660 nm)		
	pH 2	pH 3	pH 4
Isolat 9A	0,966	0,987	1,150
	0,959	0,977	1,168
	0,961	0,985	1,171
Rata-rata*	0,962 \pm 0,003	0,983 \pm 0,005	1,163 \pm 0,011

Keterangan: Nilai OD Kontrol (pH 6,5) = 1,195

OD \geq 0,1 (tahan pH rendah); OD \leq 0,1 (tidak tahan pH rendah)

*)Nilai rata-rata dari 3 kali pengulangan \pm standar deviasi nilai absorbansi isolat.

Seperti terlihat pada Tabel 1, isolat BAL 9A memiliki pertumbuhan yang baik pada kisaran pH 2 - pH 4 setelah diinkubasi selama 3 jam, sesuai waktu yang dibutuhkan makanan untuk melewati lambung (Oozer *et al.*, 2006). Lambung merupakan *barrier* pertama yang harus dilewati sebelum bakteri masuk ke dalam usus (garam empedu). Umumnya sebagian besar mikroba akan mengalami kematian dalam lambung yang memiliki kondisi lingkungan dengan pH yang rendah atau sangat asam (Corcoran *et al.*, 2005; Wijayanto, 2009). Hasil ini mengindikasikan bahwa isolat BAL 9A dapat digunakan dalam uji lanjutan.

Uji lanjutan yang dilakukan adalah uji ketahanan BAL isolat 9A terhadap garam empedu (*bile salt*). Pengujian ini dilakukan dengan cara penumbuhan isolat dalam media MRScairyang mengandung NaDC yang merupakan derivat asam empedu dengan konsentrasi yang bervariasi antara 0,2 mM, 0,4 mM, dan 0,6 mM selama 24 jam. Hasil pengujian ketahanan BAL isolat 9A terhadap NaDC dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Ketahanan Isolat BAL 9A terhadap Natrium Deoksikolat (NaDC)

Kode Isolat	Indikator Pertumbuhan BAL (<i>Optical Density</i> (OD) pada λ 660 nm)		
	NaDC 0,2 mM	NaDC 0,4 mM	NaDC 0,6 mM
Isolat 9A	0,978	0,490	0,231
	0,981	0,498	0,218
	0,975	0,488	0,223
Rata-rata	0,978 \pm 0,003	0,492 \pm 0,005	0,224 \pm 0,006

Keterangan: Nilai OD Kontrol = 1,227

OD \geq 0,1 (tahan NaDC); OD \leq 0,1 (tidak tahan NaDC)

*)Nilai rata-rata dari 3 kali pengulangan \pm standar deviasi nilai absorbansi isolat.

Pada Table 2, BAL isolat 9A memiliki ketahanan terhadap NaDC dengan konsentrasi 0,2 mM – 0,6 mM, meskipun terjadi penurunan laju pertumbuhan ketika konsentrasi NaDC semakin ditingkatkan. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh

Thamacharoensuk *et al.* (2013) yang menguji ketahanan isolat bakteri asam laktat pada media yang mengandung garam empedu dengan konsentrasi yang berbeda, adanya peningkatan kematian sel mikroba sejalan dengan meningkatnya konsentrasi cairan empedu yang digunakan dalam perlakuan. Menurut Smet *et al.* (1995), beberapa BAL memiliki enzim *bile salt hydrolase* (BSH) dengan aktivitas untuk menghidrolisis garam empedu. Enzim ini mampu mengubah kemampuan fisik dan kimia yang dimiliki oleh garam empedu, sehingga tidak bersifat toksik bagi BAL. Hal inilah yang memungkinkan menjadi penyebab BAL tahan terhadap keadaan garam empedu. Namun semakin tinggi konsentrasi garam empedu, maka jumlah sel mikroba yang mati juga akan meningkat. Hal ini disebabkan peningkatan aktivitas enzim intraseluler dari bakteri (β -galaktosidase) terhadap garam empedu, sehingga meningkatkan permeabilitas membran sel. Peningkatan permeabilitas sel akan mengakibatkan banyaknya materi intraseluler yang keluar dari dalam sel. Bila hal ini berlangsung terus menerus akan menyebabkan lisis bakteri (Wijayanto, 2009).

SIMPULAN

BAL isolat 9A hasil isolasi dari kolon sapi bali, berpotensi untuk dikembangkan menjadi kandidat probiotik baru karena menunjukkan sifat toleransi terhadap pH rendah (bertahan hidup pada kondisi pH 2) dan konsentrasi NaDC yang relatif tinggi (konsentrasi 0,6 mM).

SARAN

Perlu dilakukan uji lanjutan berupa uji aktivitas biotransformasi dari asam kolat menjadi asam deoksikolat, hidrofobisitas permukaan sel, aktifitas antimikroba dan ketahanan terhadap antibiotika.

DAFTAR PUSTAKA

- Corcoran BM, Stanton C, Ross RP. 2005. Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. *Appl. Environ Microbiol* 71(6):3060-3067.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. 1998. Fermented Fruits and Vegetables : A Global Perspective. *Fao Agricultural Services Bulletin No. 134*. Rome. Italy. <http://www.fao.org/docrep/x0560e/x0560e00.htm#con>. Tanggal akses 15 Maret 2015.
- Gorbach SL. 2001. *Microbiology of the Gastrointestinal Tract*. <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch095.htm> (Diakses tanggal 22 Januari 2015).

- Guntoro S. 2002. *Membudidayakan Sapi Bali*. Kanisius. Yogyakarta.
<https://books.google.co.id/books?id=z6UWU2ysumcC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>. Tanggal akses 22 Januari 2015.
- Hall JB, Silver S. 2009. Nutrition and Feeding of the Cow-Calf Herd: Digestive System of the Cow. College of Agriculture and Life Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University. *Virginia Tech*. www.ext.vt.edu.
- Jeevaratnam K, Jamuna M, Bawa AS. 2005. Biological preservation of foods-bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian journal of biotechnology* 4:446-454.
- Liana SM, Arfan A, Merint. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat pada Usus Ayam Broiler. *Agripet* 13(1):43-48.
- Oozer R, Leplingard A, Mater DDG, Mogenet A, Michelin R, Seksek I, Marteau P, Dore J, Bresson JL, Corthier G. 2006. Survival of *Lactobacillus casei* in the Human Digestive Tract After Consumption of Fermented Milk. *Appl and Enviro Microbiol* 5615-5617.
- Romadhon, Subagiyo, Sebastian M. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Usus Udang Penghasil Bakteriosin sebagai Agen Antibakteria pada Produk-Produk Hasil Perikanan. *Jurnal Saintek Perikanan* 8(1):59-64.
- Smet ID, Hoorde LV, Woestyne MV, Christiaens H, Verstraete W. 1995. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol* 79:292-301.
- Suardana IW, Suada IK, Sukada IM, Suarsana IN. 2009. Isolasi dan Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat SR9 Asal Cairan Rumen Sapi Bali sebagai Kandidat Unggul Probiotik. *Medicine* 40(2) : 100-103.
- Sujaya IN, Dwipayani NMU, Suarini NMP, Widarini NP, Nociantri KA, Nursini NW. 2008. Potensi *Lactobacillus spp.* Isolat susu Kuda Sumbawa sebagai Probiotik. *Jurnal Veteriner* 9(1):33-40.
- Surono IS. 2004. *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan*. PT. Tri Cipta Karya. Jakarta.
- Thamacharoensuk T, Nuttha T, Malai T, Vasana T, Kentaro K, Somboon T. 2013. Screening and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Animal Faeces for Probiotic Properties. *Thai J Vet Med* 43(4):541-551.
- Wheeler WE, Noller CH. 1977. Gastrointestinal Tract pH and Starch in Feces of Ruminants. *Journal of Animal Science* 44(1):131-135.
- Wijayanto U. 2009. Analisis in Vitro Toleransi Isolat Bakteri Asam Laktat Asal Daging Sapi Terhadap pH Lambung, pH Usus dan Garam Empedu sebagai Kandidat Probiotik. (Skripsi). Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ziemer CJ, Gibson GR. 1998. A overview of Proboitic, Prebiotic and Symbiotic in the functional food concept. Prospectives and Future Strategies. *International dairy Journal* 8:473-479.