

# Eksopolisakarida dari *Lactobacillus* sp. Isolat Susu Kuda Sumbawa dan Potensinya sebagai Prebiotik

(EXOPOLYSACCHARIDES FROM *LACTOBACILLUS* SP. ISOLATED FROM SUMBAWA MARE'S MILK AND ITS POTENTIAL APPLICATION AS PREBIOTICS)

I Nengah Sujaya<sup>1,2</sup>, Ni Putu Desy Aryantini<sup>1,2</sup>, Ni Wayan Nursini<sup>2</sup>,  
Cok. Istri Dewiyani Cakrawati<sup>1</sup>, Ni Luh Made Ema Juliasari<sup>1</sup>,  
Ni Made Utami Dwipayanti<sup>1</sup>, Yan Ramona<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Ilmu Kesehatan Masyarakat, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, Jln Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia, Tel/Fax : +62 361 744 8773; Email: sakabali@hotmail.com

<sup>2</sup>UPT. Laboratorium Terpadu Biosain dan Bioteknologi, Unud, Gedung AD, Komplek Fakultas Peternakan Bukit Jimbaran, Badung, Bali, Indonesia,

<sup>3</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Unud, Bukit Jimbaran, Badung, Bali, Indonesia, Tel : +62 361 303137

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menemukan *Lactobacillus* yang dapat membentuk eksopolisakarida (EPS) yang diisolasi dari susu kuda sumbawa serta potensi EPS yang dihasilkan sebagai prebiotik yang dapat menstimulasi pertumbuhan *Bifidobacterium breve*. Sebanyak sembilan strain *Lactobacillus* sp. yang diisolasi dari susu kuda sumbawa diskriminasi pembentukan EPS pada medium *Mann Ragosa Agar/ MRS* yang dimodifikasi dengan penambahan sukrosa. Potensi prebiotik diuji dengan melihat pertumbuhan *B. breve* pada medium mengandung EPS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sembilan strain *Lactobacillus* spp. yang dipergunakan dapat menghasilkan eksopolisakarida dimana *Lactobacillus* sp. SK3 1. dan *Lactobacillus* sp. SK4 memproduksi EPS lebih banyak dibandingkan dengan strain lain yang dipergunakan. Dari penelitian ini juga diketahui bahwa EPS tidak dapat dimetabolisme langsung oleh *B. breve* tanpa dihidrolisis terlebih dahulu menjadi molekul yang lebih sederhana. Hasil hidrolisis EPS dengan asam klorida/HCl dapat dimanfaatkan oleh *B. breve* dengan baik sehingga EPS mempunyai potensi sebagai prebiotik.

Kata kunci : *Lactobacillus*, eksopolisakarida, susu kuda sumbawa, prebiotik

## ABSTRACT

This research aimed to isolate exopolysaccharides (EPS) producing *Lactobacilli* isolated from sumbawa mare's milk and its potential as prebiotics for modulating the growth of *Bifidobacterium breve*. Nine strains of *Lactobacillus* sp. were screened for their capabilities to produce EPS using modified MRS medium containing sucrose. Prebiotics potential of the EPS was verified by culturing *B. breve* JCM1273 in TOS medium containing EPS. The results showed that all strains of *Lactobacillus* sp. produced EPS on MRS sucrose medium and two strains (*Lactobacillus* SK3.1 and *Lactobacillus* SK4) produced more EPS compared to the other strains tested. *Bifidobacterium breve* JCM1273 showed weak activity while in direct metabolism of EPS produced by *Lactobacillus* sp. SK4 and its growth was enhanced on acid hydrolyzed EPS. Since this phenomenon might happened when the EPS exposed by the low pH during gastric passage, hence the EPS might be a potential source to be developed as prebiotics. Nevertheless, further investigation is necessary to evaluate the bifidogenic affects of EPS in *Lactobacillus* sp. SK4.

Keywords: *Lactobacillus*, exopolysaccharides, sumbawa mare's milk, prebiotic

## PENDAHULUAN

Susu kuda sumbawa yang dikenal luas di masyarakat sebagai susu kuda liar merupakan susu hasil perahan kuda yang dilepas di padang rumput di beberapa tempat, seperti di Kabupaten Bima, Dompu dan Sumbawa Provinsi Nusa Tenggara Barat. Sejak tahun 1980, susu kuda sumbawa banyak diklaim dapat memberikan dampak menguntungkan terhadap kesehatan manusia seperti membantu proses penyembuhan berbagai penyakit infeksi seperti *bronchitis*, paru-paru basah, tifus, menurunkan kolesterol, dan diabetes melitus (Hermawati *et al.*, 2004; Rijatmoko, 2001). Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat pada susu kuda sumbawa yang ditemukan bahwa *Lactobacillus* merupakan bakteri asam laktat (BAL) utama pada susu kuda sumbawa (Marsiadewi *et al.*, 1997; Sujaya *et al.*, 2008a). Potensi beberapa strain *Lactobacillus rhamnosus* yang diisolasi telah dilakukan (Sujaya *et al.*, 2008b). Namun demikian, dampak menyehatkan dari mengonsumsi susu kuda sumbawa belum diketahui secara pasti. Keberadaan BAL sebagai bakteri dominan pada susu kuda sumbawa memicu hipotesis bahwa dampak menyehatkan dari konsumsi susu kuda sumbawa berkaitan dengan adanya BAL pada susu kuda sumbawa yang mampu bertahan dan berkembang biak pada saluran pencernaan manusia dan sebagai probiotik hasil degradasi komponen susu kuda sumbawa oleh mikroorganisme pada susu kuda sumbawa serta keberadaan komponen/metabolit sel BAL seperti eksopolisakarida (EPS) sebagai prebiotik. Semua ini secara akumulatif memodifikasi bakteri menguntungkan dalam saluran pencernaan manusia khususnya *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*.

Prebiotik merupakan jenis karbohidrat (sakarida) yang dapat memacu pertumbuhan bakteri menguntungkan. Sekumpulan polisakarida non pati, pati yang tidak terhidrolisis (*resistant starches*), gula yang tidak dapat dicerna (*undigested sugar*), oligosakarida, dan protein merupakan prebiotik yang difermentasikan oleh mikroflora di dalam kolon (Gibson dan Roberfroid, 1995; Saarela *et al.*, 2002). Beberapa jenis prebiotik yang banyak diteliti dan terbukti memberikan dampak menyehatkan manusia secara umum terdiri dari golongan oligosakarida seperti *fructooligo-saccharides* (FOS) dan *galactooligosaccharides* (GOS) (Critenden dan Playne, 1996). Prebiotik yang beredar di pasar umumnya diperoleh dari sumber tanaman dan

produk hewan seperti gula susu serta hasil sintesis dan hidrolisis enzimatis. Prebiotik berasal dari komponen sel sangat terbatas. Mikroorganisme dapat mensintesis polisakarida serta disekresikan ke luar sel yang disebut dengan eksopolisakarida (EPS) (Madigan *et al.*, 1997). Berbagai species BAL penghasil EPS sudah dipergunakan sebagai starter bahan pangan sebagai bahan penstabil, pencampur atau sebagai *gelling agent* yang penting untuk memodifikasi tekstur produk (Sutherland, 1998; van Kranenburg *et al.*, 1999), selain itu, juga telah diketahui bahwa EPS yang dihasilkan oleh BAL tertentu ternyata dapat digunakan sebagai bahan makanan tambahan yang dapat memberikan dampak menguntungkan terhadap kesehatan manusia, seperti dapat menurunkan kadar kolesterol (Nakajima *et al.*, 1992, Pigeon *et al.*, 2002), menstimulasi sistem pertahanan tubuh dan meningkatkan aktivitas antitumor (Hosono *et al.*, 1997, Kitazawa *et al.*, 1998, Chabot *et al.*, 2001). Saat ini EPS yang dihasilkan oleh BAL telah direkomendasikan sebagai prebiotik (Gibson dan Roberfroid, 1995, Dal Bello *et al.*, 2001, Korakli *et al.*, 2002). Adanya berbagai dampak menguntungkan dari EPS yang diproduksi oleh BAL maka kini mulai disadari pentingnya menambahkan EPS pada makanan yang dikonsumsi setiap hari sehingga diperlukan EPS dalam jumlah besar yang bisa diproduksi dengan rekayasa genetika.

Sejauh ini BAL yang diklaim dapat menghasilkan eksopolisakarida adalah BAL dari genus *Lactococcus*, *Pediococcus* dan yang paling populer adalah genus *Lactobacillus*. Sejumlah informasi telah dipublikasikan tentang species BAL penghasil EPS yang diisolasi dari berbagai produk pangan yang mengandung atau dibuat dengan memanfaatkan aktivitas BAL (Van den Berg *et al.*, 1993; Ludbrook *et al.*, 1997), serta dari saluran pencernaan dan plak gigi (Van Gell-Schutten *et al.*, 1998).

Di sisi lain, adanya kandungan BAL seperti golongan lactobacilli yang berpotensi menghasilkan EPS memungkinkan susu kuda sumbawa dijadikan sumber prebiotik isolat lokal Indonesia. Berkaitan dengan upaya pengembangan sumber prebiotik baru, menurut Gibson dan Roberfroid (1995) sangat diperlukan berasal dari mikroorganisme bukan patogen untuk menjamin keamanannya EPS prebiotik yang dihasilkan. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan *Lactobacillus* yang dapat membentuk EPS yang diisolasi dari susu kuda sumbawa serta potensi EPS yang dihasilkan sebagai prebiotik yang

dapat menstimulasi pertumbuhan *B. breve*. Penelitian ini diharapkan memberi sumbangan dalam eksplorasi potensi bioteknologi lactobacilli isolat susu kuda sumbawa serta dalam konservasi sumber mikroba Indonesia.

**METODE PENELITIAN**

**Materi Hidup**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bersama Program Studi Ilmu Kesehatan Masyarakat dan Laboratorium Biosains dan Bioteknologi Universitas Udayana. Strain mikroorganisme yang dipergunakan pada penelitian ini adalah koleksi Lab Terpadu Biosain dan Bioteknologi Universitas Udayana (Tabel 1).

**Penyegaran Kultur Mikroorganisme**

Isolat *Lactobacillus* sp dari stok beku dalam gliserol yang disimpan pada suhu -20°C disegarkan dengan cara diinokulasi sekitar 10 µl ke dalam 5 ml MRS broth (Pronadisa) yang telah disiapkan sebelumnya. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Strain dibuat dalam kultur tusuk (*stab culture*) MRS agar (Pronadisa) yang selanjutnya dipergunakan dalam penelitain ini. Kultur disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 5°C.

**Skrining *Lactobacillus* sp. Penghasil EPS Isolat Susu Kuda Sumbawa**

Medium yang digunakan adalah *Sucrose Yeast Extract Peptone*/ SYP merupakan modifikasi *Glucose Yeast Extract Peptone*/ GYP

medium (Kozai *et al.*, 1992) yang mana penggunaan glukosa diganti dengan sukrosa. Komposisi medium adalah sebagai berikut: 20,0 g/L sukrosa; 10,0 g/L *yeast extract*; 10,0 g/L *peptone* ; 5,0 g NaCH<sub>3</sub>COOH.3H<sub>2</sub>O ; 5,0 ml larutan mineral yang mengandung (per ml) : 40,0 mg MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ; 2,0 ml MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O ; 7,0 mg FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ; 2,0 mg NaCl) ; 10,0 ml larutan yang mengandung 50,0 g/L Tween 80 dan 12,0 g/L agar (Kozaki *et al.*,1992). Medium disterilisasi dengan cara di-*autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dikeluarkan dari *autoclave*, di-*stirer* ketika suhunya telah mencapai 50-55°C, media dituang ke dalam cawan petri steril.

Isolat *Lactobaccillus* sp yang telah disiapkan sebelumnya dicuci dengan larutan NaCl 0,85% sebanyak dua kali, kemudian diinokulasi dengan menggunakan ose lurus ke dalam media agar (media *GYP* yang telah dimodifikasi). Media yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi di dalam inkubator selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi selama 24-48 jam dilakukan pengamatan terhadap terbentuknya EPS pada permukaan media agar yang ditandai dengan terbentuknya lendir di sekitar tusukan koloni. Diameter lendir diukur dengan jangka sorong dan isolat dengan diameter lendir paling besar dipilih untuk dipergunakan dalam penelitian selanjutnya.

**Produksi EPS dari *Lactobacillus* sp. Isolat Susu Kuda Sumbawa**

Strain yang dipergunakan adalah *Lactobacillus* sp. SK 4, *Lactobacillus* sp. SK 14 dan *Lactobacillus fermentum* JCM 1173 yang

Tabel 1.Mikroorgansime yang dipergunakan pada penelitian ini

Strain*)	Sumber
<i>Lactobacillus</i> sp. SK3.1	Susu kuda sumbawa
<i>Lactobacillus</i> sp. SK3.2	Susu kuda sumbawa
<i>Lactobacillus</i> sp. SK4	Susu kuda sumbawa
<i>Lactobacillus</i> sp. SK5.1	Susu kuda sumbawa
<i>Lactobacillus</i> sp. SK5.2	Susu kuda sumbawa
<i>Lactobacillus</i> sp. SK8	Susu kuda sumbawa
<i>Lactobacillus</i> sp. SK14	Susu kuda sumbawa
<i>Lactobacillus</i> sp. SK17	Susu kuda sumbawa
<i>Lactobacillus</i> sp. SK21	Susu kuda sumbawa
<i>Lactobacillus fermentum</i> JCM 1173	-
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 1273	Saluran pencernaan bayi

\*) Koleksi UPT Lab. Terpadu Biosain dan Bioteknologi, Universitas Udayana.  
JCM : *Japan Collection of Microorganisms*

sebelumnya disegarkan dalam MRS *broth* (Pronadisa). Produksi EPS dilakukan pada media SYP agar yang diinokulasi dengan cara menusukkan sel (*strain producers*) di beberapa tempat pada permukaan agar. Setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C, EPS diisolasi dengan menambahkan 20 ml air steril ke dalam media SYP agar, selanjutnya digoyang pada kecepatan 70 rpm selama 10 menit. Suspensi EPS yang diperoleh ditampung di dalam botol steril.

**Pengujian Potensi Prebiotik EPS yang Diproduksi oleh *Lactobacillus* sp. Isolat Susu Kuda Sumbawa**

Potensi prebiotik EPS diuji dengan mempergunakan medium *Transoligosaccharides* (TOS, Yakult, Co.ltd. Japan; Matsuki *et al.*, 1999) yang dimodifikasi yakni penggunaan *transoligosaccharides* diganti dengan EPS. Setiap liter medium yang digunakan mengandung: 10,0 g tripticase ;1,0 g *yeast extract* ; 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ; 3,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 4,8 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 3,0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; 0,5 g L-cystein (SIGMA) yang disuspensikan pada suspensi EPS dengan tingkat kekeruhan (OD<sub>660 nm</sub>) 08,8. Derajat keasaman (pH) medium diatur menjadi 6,8-7,0 dengan pH meter. Selain medium TOS modifikasi EPS juga dibuat medium TOS menggunakan 1% glukosa. Medium selanjutnya disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Sebanyak 50 µl kultur aktif *B. breve* JCM1273 yang sebelumnya ditumbuhkan pada media MRS mengandung 0,05% L-cystein selama 48 jam pada suhu 37°C di dalam *jar* anaerob. Pertumbuhan *B. breve* JCM1273 diukur dengan mengamati tingkat kekeruhan (*Optical Density*) pada panjang gelombang 660<sub>nm</sub>. Pertumbuhan *B. breve* JCM1273 juga diamati pada TOS medium mengandung 1% EPS yang sudah dihidrolisis dengan HCl 4 N selama 1 jam dengan pemanasan pada air mendidih.

**Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Komponen Sakarida dari Eksopolisakarida yang Diproduksi oleh *Lactobacillus* sp Isolat Susu Kuda Sumbawa**

Untuk melihat jenis gula yang mungkin dihasilkan dari fermentasi EPS oleh *B. breve* 1273 dilakukan dengan *men-spot* 2µl EPS sebelum dan sesudah difermentasi pada TLC (*Aluminium TLC sheet, silica gel* 60, E-Merck 1.05553, Germany). Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dielusi selama 30 menit di dalam *chamber* gelas dengan pelarut *n*-butanol: *i*-propanol: asam asetat: aquades dengan perbandingan volume 7:5:2:4 (semua bahan kimia yang dipergunakan adalah kualitas analitis (*analytical grade*, E-Merck, Germany). Lembar KLT dikeringkan dengan *hair dryer* dan disemprot dengan pelarut yang terdiri dari campuran etanol absolut: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: *p*-anisaldehid dengan perbandingan volume 18:1:1. Setelah dikeringkan dengan *hair dryer* dipanaskan pada oven suhu 140°C sampai muncul bercak (*spots*) karbohidrat dan selanjutnya difoto (Sujaya *et al.*, 2008c).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Pada penelitian ini telah dilakukan skrining pembentukan EPS pada sembilan isolat *Lactobacillus* sp. yang diisolasi dari susu kuda sumbawa. Semua isolat *Lactobacillus* mampu menghasilkan EPS yang ditandai dengan pembentukan lendir dengan menggunakan sukrosa sebagai sumber karbon. Dari hasil pengamatan diperoleh *Lactobacillus* sp. SK4 dan *Lactobacillus* sp. SK3.1 menghasilkan EPS dengan diameter lendir 58 mm dan 48 mm (Gambar 1 dan Gambar 2). Pengukuran terhadap kekeruhan (OD<sub>660nm</sub>) pada suspensi EPS yang diperoleh juga menunjukkan bahwa *Lactobacillus* sp. SK4 menghasilkan nilai kekeruhan OD<sub>660nm</sub> sebesar 2,931 yang lebih tinggi dari *Lactobacillus* sp. SK3.1 (nilai OD<sub>660nm</sub> sebesar 2,067) dan *L. fermentum* JCM1173 (nilai

Tabel 2. Konsentrasi eksopolisakarida yang diproduksi oleh *Lactobacillus* sp. isolat susu kuda sumbawa

Eksopolisakarida	Konsentrasi (OD <sub>660nm</sub> )	pH
<i>Lactobacillus</i> sp. SK3.1	2,067	5,77
<i>Lactobacillus</i> sp. SK4	2,931	5,96
<i>Lactobacillus fermentum</i> JCM 1173	1,527	4,31

JCM : *Japan Collection of Microorganisms*

OD<sub>660nm</sub> sebesar 1,527). Hal tersebut juga menunjukkan bahwa *Lactobacillus* sp. SK4 memproduksi EPS sebanyak 1,42 kali dan 1,92 kali lebih banyak dibandingkan dengan *Lactobacillus* sp. SK3.1 dan *L. fermentum* JCM1173.

Namun demikian keragaman molekul penyusun EPS dilaporkan sangat bervariasi antar species dan perbedaan ini terkait dengan fungsi yang dapat ditimbulkannya (Kleerer-bezerm *et al.*, 1999).

Mengingat pentingnya potensi EPS dari *Lactobacillus* sp dalam pengembangan bahan pangan fungsional khususnya untuk menstimulasi bakteri menguntungkan dalam saluran pencernaan, maka peranan *Lactobacillus* sp pada susu kuda sumbawa merupakan target eksklusif dalam pengembangan senyawa baru (*novel compounds*) yang secara spesifik dapat menstimulasi pertumbuhan bakteri menguntungkan pada saluran pencernaan. Potensi tersebut berdasarkan kemungkinan adanya unit penyusun EPS yang khas (Sutherland, 1998), sehingga dapat menjadi peluang untuk menemukan prebiotik asal EPS bakteri. Hal tersebut semakin menarik mengingat *Lactobacillus* umumnya aman untuk dikonsumsi (*foodgrade*) maka EPS yang dihasilkan adalah *food grade* (Kleererbezerm *et al.*, 1999), di samping secara historis susu kuda sumbawa sudah dikonsumsi oleh masyarakat di Pulau Sumbawa sejak dahulu, sehingga *Lactobacillus* yang diisolasi pun bersifat *food grade* dan aman bagi konsumsi manusia.

Untuk mengetahui potensi EPS yang diproduksi oleh *Lactobacillus* isolat susu kuda sumbawa sebagai prebiotik, maka EPS yang dihasilkan digunakan untuk memodulasi pertumbuhan bakteri yang menguntungkan bagi kesehatan yang ada pada saluran pencernaan manusia. *B. breve* merupakan salah satu bakteri endogen saluran pencernaan yang mendominasi usus besar manusia (Matsuki *et al.*, 1999; Mitsuoka, 1982; Sgorbati *et al.*, 1995). Strain *B. breve* JCM1273 sebelumnya telah diuji kemampuannya sebagai probiotik (Sujaya *et al.*, 2006), sehingga penggunaan strain ini mempunyai suatu potensi sebagai probiotik baru. Di lain pihak, EPS yang sedang disekrining ini juga adalah potensi pengembangan prebiotik yang bersumber dari sel BAL yang karena susu kuda sumbawa telah lama dikonsumsi maka sel BAL yang termasuk EPS yang terbentuk adalah aman bagi konsumsi manusia. Dengan demikian produksi EPS yang *foodgrade* sebagai makanan fungsional (prebiotik) sangat relevan. Di sisi lain, penelitian ini hanya terbatas pada *B. breve* karena untuk mendegradasi polimer (oligo/polisakarida) pada EPS strain *Bifidobacterium* umumnya mempunyai kemampuan sakarolitik lebih baik dibandingkan dengan *Lactobacillus* (Cummings, 1997).

Pada pengembangan prebiotik maka senyawa yang diuji harus tidak diserap dan dihidrolisis oleh enzim saluran pencernaan sehingga dapat menjadi substrat untuk pertumbuhan bakteri menguntungkan di dalam

Tabel 3. Pertumbuhan dan pH *Bifidobacterium breve* JCM1273 pada medium TOS mengandung EPS sebelum dan sesudah dihidrolisis

Medium TOS mengandung	Strain penghasil EPS	OD <sub>660</sub>	pH
Sebelum dihidrolisis	SK3.1	0,022 + 0,004	6,62 + 0,01
	SK4	0,055 + 0,004	6,68 + 0,03
	JCM1173	0,027 + 0,002	6,25 + 0,01
EPS	SK3.1	0,072 + 0,003	5,87 + 0,03
	SK4	0,172 + 0,014	5,20 + 0,02
	JCM1173	0,093 + 0,003	5,47 + 0,02
Glukosa		0,908 + 0,023	4,03 + 0,02

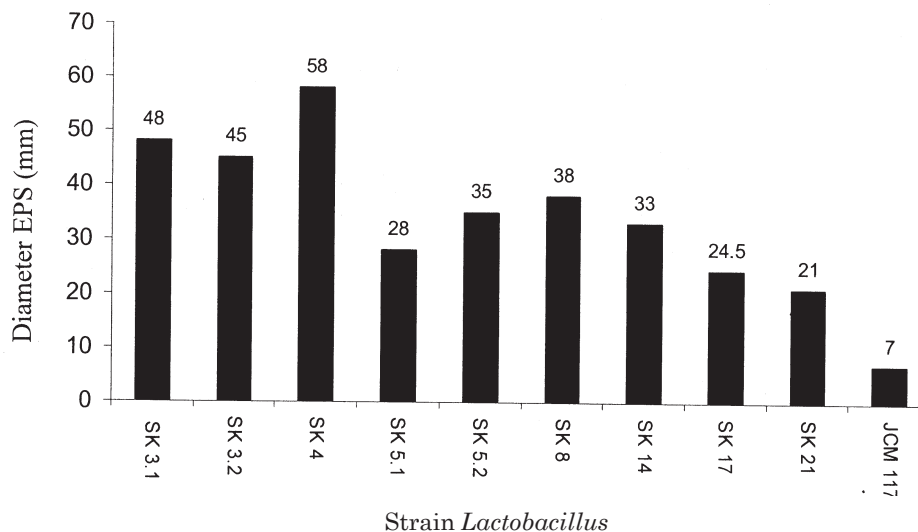
Percobaan diulang sebanyak 3 kali.

EPS : eksopolisakarida

TOS : *Transoligosaccharide*

JCM : *Japan Collection of Microorganisms*

OD : *Optical Dencity*

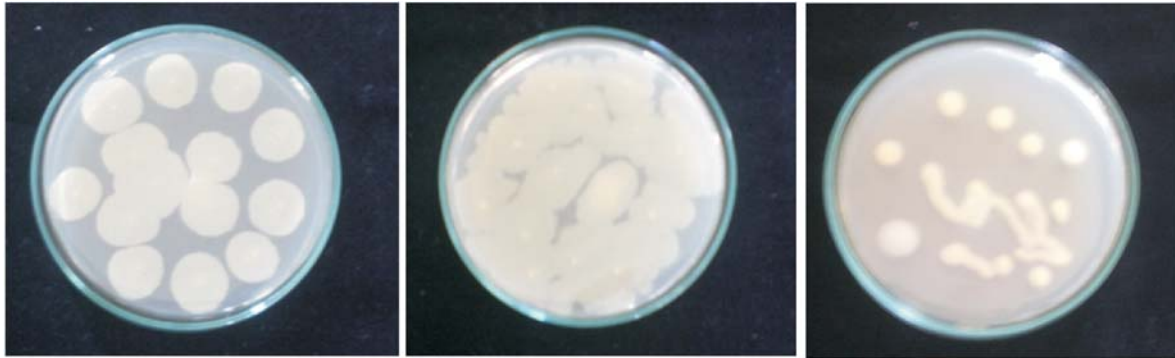


Gambar 1. Produksi eksopolisakarida dan *Lactobacillus* sp. isolat susu kuda sumbawa dan *L. fermentum* JCM1173

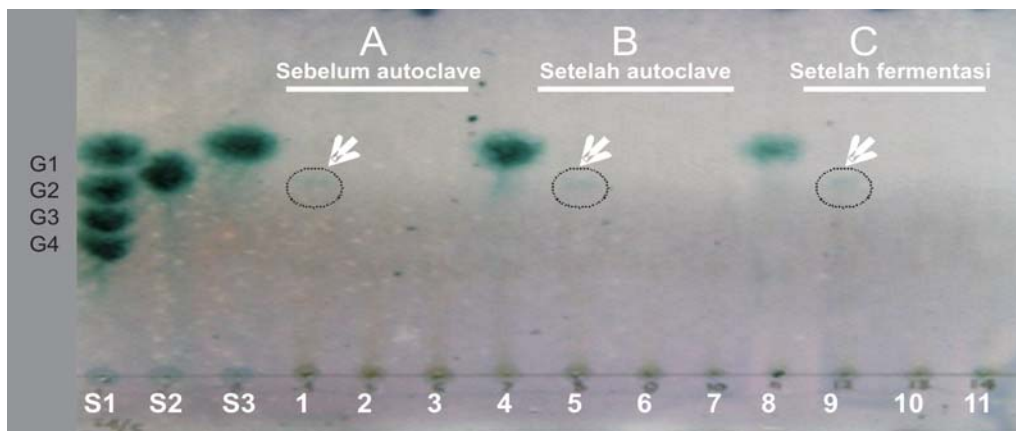
saluran pencernaan, khususnya *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (Gibson dan Roberfroid, 1995; Roberfroid, 2001) sehingga EPS yang dihasilkan tahan terhadap pH rendah dan kondisi saluran pencernaan. Untuk mengukur potensi prebiotik EPS *Lactobacillus* spp. isolat susu kuda sumbawa yang telah terpilih pada penelitian ini, juga dilakukan dengan mengukur kekeruhan dan penurunan pH medium karena aktivitas pertumbuhan *B. breve* JCM1273. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *B. breve* JCM1273 menunjukkan aktivitas yang sangat rendah dalam memanfaatkan EPS secara langsung sebagai sumber karbon yang terlihat dengan rendahnya nilai kekeruhan ( $OD_{660nm}$ ) serta tingginya nilai pH medium (Tabel 4). Namun demikian, pertumbuhan dan aktivitas *B. breve* JCM1273 meningkat setelah EPS dihidrolisis. Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas sakarolitik *B. breve* sangat rendah terhadap EPS sehingga pertumbuhan dan aktivitas meningkat apabila polimer EPS telah dihidrolisis. Hal tersebut juga berarti bahwa efek bifidogenik dari EPS mungkin baru bisa dijelaskan pada penelitian *in vivo* karena terjadinya hidrolisis EPS oleh konsorsium mikroorganisme pada saluran pencernaan akan memungkinkan terjadinya *cross feeding* antar mikroorganisme yang salah satunya adalah *Bifidobacterium*.

Pada penelitian dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT) pada sakarida pada EPS sebelum dan sesudah difermentasi untuk menganalisis jenis sakarida yang terdapat pada

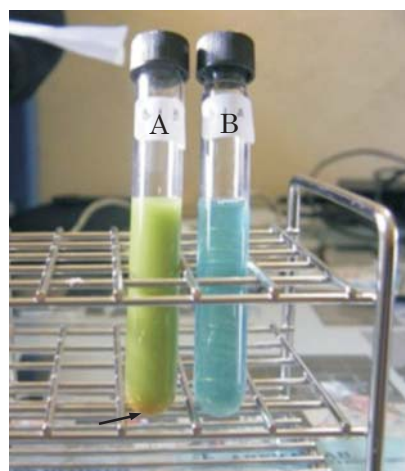
eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Lactobacillus* sp isolat susu kuda sumbawa (Gambar 2). Eksopolisakarida yang dihasilkan oleh SK4 mempunyai struktur yang kuat terbukti dengan daya tahannya setelah diautoclave (Gambar 3 panel B). Struktur yang kuat dan belum bisa dijelaskan dalam penelitian ini, sehingga nampaknya sedikit sekali dihidrolisis secara langsung oleh *B. breve*. Hal serupa juga dilaporkan pada inulin (prebiotik) yang dapat menstimulasi *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* sangat lemah dihidrolisis oleh *B. breve* (Sgorbati *et al.*, 1995). Pertumbuhan *B. breve* JCM1273 semakin baik apabila EPS dihidrolisis dengan asam (Tabel 3). Walaupun belum jelas apakah EPS terhidrolisis dengan sempurna atau tidak (tidak ada data) tetapi dengan terbentuknya endapan merah bata setelah hasil hidrolisis dengan HCL dari EPS ditambahkan larutan *Luff schoorl*, yang memberikan gambaran bahwa terbentuk gula pereduksi dari hasil hidrolisis EPS (Gambar 4). Kleerebezem *et al.*, (1999) melaporkan bahwa unit gula penyusun EPS yang diproduksi oleh *Lactococcus lactis* NIZO B40 adalah rhamnosa, galaktosa, dan glukosa, walaupun fruktosa dan glukosa sebagai sumber karbon pertumbuhan. Dengan demikian, diduga struktur penyusun EPS dari *Lactobacillus* sp. SK4 adalah campuran ketiga sakarida di atas sehingga terjadinya endapan merah bata, yang terbentuk hanya sesudah dilakukan hidrolisis, akibat pemecahan polimer menjadi gula pereduksi yang sekaligus membuktikan bahwa EPS memang diproduksi



Gambar 2. Eksopolisakarida yang diproduksi oleh *Lactobacillus* sp isolat susu kuda sumbawa. A. *Lactobacillus* sp SK3.1; B. *Lactobacillus* sp SK4; C. *L. fermentum* JCM1173



Gambar 3. Eksopolisakarida dari *Lactobacillus* sp sebelum (A dan B) dan setelah difermentasikan oleh *B. breve* JCM1273 (C). S1 : Standar G1-G4 (G1; glucose; G2: maltosa; G3: malto-triosa; G4: malto tetrosa); S2 : Standar sukrosa ; S3 : Standar fruktosa; 1 : EPS JCM 1173 sebelum disterilisasi; 2 : EPS SK 4 sebelum disterilisasi; 3 : EPS SK 3.1 sebelum disterilisasi; 4 : Glukosa sebelum difermentasi; 5 : EPS JCM 1173 sebelum fermentasi; 6 : EPS SK4 sebelum fermentasi; 7 : EPS SK3.1 sebelum fermentasi ; 8 : Glukosa setelah difermentasi ; 9 : EPS JCM1173 setelah difermentasi ; 10 : EPS SK4 setelah difermentasi; 11 : EPS SK3.1 setelah difermentasi; Tanda panah : residu sukrosa pada EPS.



Gambar 4. Endapan merah bata (tanda panah) yang terbentuk setelah EPS dari *Lactobacillus* sp. SK4 dihidrolisis dengan HCl ditambahkan dengan pereaksi *Luff Schoorl* (A) dan EPS tanpa dihidrolisis dengan HCL (B).

dari dalam penelitian ini (Gambar 4). Hal tersebut kemungkinan analog dengan kondisi saluran pencernaan manusia. Ketika polisakarida memasuki saluran pencernaan bagian atas kemungkinan EPS tersebut akan sebagian dipecah oleh asam lambung dan enzim-enzim pemecah sakarida pankreas dan usus menjadi gula-gula yang lebih sederhana (oligosakarida) sehingga ketika masuk ke saluran pencernaan bagian bawah dapat diuraikan oleh bakteri dari golongan *Bifidobacteria*. Namun demikian hipotesis ini memerlukan penelitian lebih mendalam guna mengembangkan potensi EPS dari *Lactobacillus* sp SK4 sebagai prebiotik.

### SIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa semua *Lactobacillus* spp isolat susu kuda sumbawa yang dipergunakan dalam penelitian ini dapat menghasilkan eksopolisakarida. Dua isolat *Lactobacillus* sp SK3.1 dan *Lactobacillus* sp SK4 sebagai strain potensial penghasil EPS. Eksopolisakarida dari *Lactobacillus* sp SK4 sulit dihidrolisis secara langsung oleh *B. breve* JCM1273 tetapi dengan hidrolisis EPS dapat dimanfaatkan dengan baik oleh *B. breve* JCM1273.

### SARAN

Penelitian ini baru pada tahap *in vitro* sehingga disarankan agar dilakukan penelitian secara *in vivo* sehingga efek prebiotik EPS yang diproduksi oleh *Lactobacillus* sp SK4 dapat diketahui lebih baik.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada UPT. Lab Terpadu Biosain dan Bioteknologi yang telah membiayai penelitian ini serta Ditjen Dikti melalui Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian kepada Ni Putu Desy Aryantini dkk. dengan kontrak No. 031/SP2H/PKM/DP2M/II/2008, Tanggal 26 Februari 2008.

### DAFTAR PUSTAKA

- Chabot S, Yu HL, De Léséleuc L, Cloutier D, van Calsteren MR, Lessard M, Roy D, Lacroix M, Oth M. 2001. Exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulates TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-g in mouse splenocytes. *Lait* 81:683–697.
- Crittenden RG, Playne MJ. 1996. Production, properties and applications of food grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Technol* 7: 61-353.
- Cummings JH. 1997. *The large intestine in nutrition and disease*. Bruxelles Belgium. Institute Danone.
- Dal Bello FD, Walter J, Hertel C, Hammes WP. 2001. In vitro study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Syst Appl Microbiol* 24:232–237.
- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125:1401-1412.
- Hermawati D, Sudarwanto M, Soekerto ST, Zakaria FR, Sudardjat S, Tjatur Rasa FS. 2004. Aktivitas antimikroba pada Susu kuda sumbawa. *J Teknol Industri Pangan* 15: 47-53.
- Hosono A, Lee J, Ametani A, Natsume M, Hirayama M, Adachi T, Kaminogawa S. 1997. Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. *Biosci Biotechnol Biochem* 61:312–316.
- Kitazawa H, Harata T, Uemura J, Saito T, Kaneko T, Itoh T. 1998. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*. *Int J Food Microbiol* 40:169–175.
- Kleerebezem M, van Kranenburg R, Tuinier R, Boels IC, Zoon P, Looijesteijn E, Hugenholtz J, de Vos WM. 1999. Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties? *Ann Van Leuwenhoek* 76:357-365.
- Korakli M, Gänzle MG, Vogel RF. 2002.



- Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J Appl Microbiol* 92:958–965.
- Kozaki M, Uchimura Y, Okada S. 1992. *Manual for isolation and identification of lactic acid bacteria*. Japan. Asakura Shioteng.
- Ludbrook KA, Russell CM, Greig RI. 1997. Exopolysaccharide production from lactic acid bacteria isolated from fermented foods. *J Food Sci* 62:597–600.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 1997. *Brock Biology of Microorganisms*. 8th ed. London, UK. Prentice Hall International Ltd.
- Marsiadewi TS, Sudariani N, Febrianingsih NPE. 2007. Karakterisasi *Lactobacillus* sp. isolat Susu kuda sumbawa untuk pengembangan probiotik. Universitas Udayana. Denpasar.
- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl Environ Microbiol* 65: 4506-4512.
- Mitsuoka T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora* 1:55-64.
- Nakajima H, Hirota T, Toba T, Itoh T, Adachi S. 1992. Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Carbohydr Res* 224:245–253.
- Pigeon RM, Cuesta EP, Gilliland SE. 2002. Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria. *J Dairy Sci* 85:2705–2710.
- Rijatmoko MB. 2001. Pengaruh susu kuda sumbawa terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* secara *in vitro*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Ruberfroid MB. 2001. Prebiotics: preferential substrates for specific germ? *Am J Clin Nutr* 73:406S-409S.
- Saarela M, Lahteenmaki L, Ctittenden R, Salminen S, Mattila-Sandholm T. (2002). Gut bacteria and health food-the European perspective. *Int J Food Microbiol* 78 : 99-117.
- Sgorbati B, Biavati B, Palenzona D. 1995. The genus *Bifidobacterium*. In: Wood, B.J.B and Holzapfel, W.H. (Ed). *The genera of lactic acid bacteria*. London. Blackie Academic & Professional, Pp: 279-306.
- Sujaya IN, Sukrama DM, Pinatih KJP. 2006. Efek bifidogenik buah pisang secara *in vitro* dan upaya pengembangan probiotik bifidobacterium. Jakarta. Laporan Penelitian Iptekdok Litbankes.
- Sujaya IN, Ramona Y, Utami DNM, Suariani NLP, Widarini NP, Nocianitri KA, Nursini NW. 2008a. Isolation and characterization of Lactic acid bacteria from Sumbawa mare milk. *J Vet* 9:52-59.
- Sujaya IN, Utami DNM, Suariani NLP, Widarini NP, Nocianitri KA, Nursini NW. 2008b. Probiotic characterization of *Lactobacillus* spp isolated from Sumbawa mare milk. *J Vet* 9:33-40
- Sujaya IN, Ramona Y, Sukrama DM, Nocianitri KA. 2008c. Modulasi pertumbuhan *Bifidobacterium breve* JCM1273 pada sekum tikus dengan ekstrak pisang mukun dalam upaya pengembangan probiotik *Bifidobacterium breve* berbasis konsumsi pisang mukun. Jakarta. Laporan Penelitian Hibah Bersaing Dikti, 2008.
- Sutherland IW. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* 16:41–46
- Van den Berg DJC, Smits A, Pot B, Ledebore AM, Kersters K, Verbakel JMA, Verrips CT. 1993. Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation process and culture collections. *Food Biotechnol* 7:189–205.
- Van Geel-Schutten GH, Flesch F, ten Brink B, Smith MR, Dijkhuizen L. 1998. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:697–703.
- Van Kranenburg R, Boels IC, Kleerebezem M, de Vos WM. 1999. Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: Approaches for the production of existing and novel polysaccharides. *Curr Opin Biotechnol* 10:498–504.