

# KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT YANG DIISOLASI DARI SUSU KUDA BIMA

*Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Horse Milk of Bima*

**Nyoman Semadi Antara<sup>1</sup>, I Nyoman Dibia<sup>2</sup>, Wayan Redi Aryanta<sup>1</sup>**

## ABSTRAK

Pada penelitian ini telah dilakukan karakterisasi terhadap enam spesies bakteri asam laktat (BAL) indigenous (*Lactobacillus acidophilus* KBc, *Lb. salivarius* KBd, *Lb. brevis* KBa, *Lb. delbrueckii* KBe, *Lb. plantarum* KBb dan *Lactococcus lactis* KBf) yang diisolasi dari susu kuda liar Bima terfermentasi. Pengujian yang dilakukan meliputi aspek keamanan, ketahanan hidup pada media pH rendah, kemampuan tumbuh pada media yang mengandung garam empedu, kemampuan menempel dan berkolonisasi, dan efek terhadap penurunan kadar kolesterol serum darah. Keenam spesies BAL tersebut tidak patogen dan invasif, serta dapat tumbuh baik pada media yang mengandung garam empedu 0,75 %. *Lactobacillus acidophilus* KBc dan *Lb. brevis* KBa tahan hidup pada media pH 2,5 selama 3 jam serta dapat menempel dan berkolonisasi pada epitel mukosa usus. Kedua bakteri ini mampu menurunkan kadar kolesterol serum darah kelinci dalam keadaan hiperkolesterolemia secara nyata masing-masing sebesar 53,74 % dan 51,70 %. Berdasarkan karakterisasi keenam spesies BAL tersebut, *Lb. acidophilus* KBc dan *Lb. brevis* KBa dapat dipergunakan sebagai probiotik.

**Kata kunci:** *Bakteri asam laktat, karakterisasi, probiotik, susu kuda*

## ABSTRACT

The aim of the research was to characterize of the six species of Lactic Acid Bacteria (LAB) indigenous (*Lactobacillus acidophilus* KBc, *Lb. salivarius* KBd, *Lb. brevis* KBa, *Lb. delbrueckii* KBe, *Lb. plantarum* KBb and *Lactococcus lactis* KBf) isolated from the fermented horse milk of Bima. The tests were done to cover safety aspect, ability to survive on low pH condition, bile salt tolerance, ability to adherence and colonization, and effect on cholesterol level reduction. The six LAB species were not pathogen and invasive, and were able to grow well on media which contained bile salt of 0.75 %. *Lactobacillus acidophilus* KBc and *Lb. brevis* KBa had ability to survive on media pH 2.5 for 3 hours and were able to adherence and colonization on gut mucosa epithel. *Lactobacillus acidophilus* KBc and *Lb. brevis* KBa had ability to reduce cholesterol level of blood serum of rabbits on hypercholesterolemia condition significantly up to 53.74 % and 51.70 %, respectively. Based on the characterization of the six species LAB, only *Lactobacillus acidophilus* KBc and *Lb. brevis* KBa can be used as probiotic.

**Keywords:** *Lactic acid bacteria, characterization, probiotic, horse milk*

<sup>1</sup> Laboratorium Bioindustri, Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Kabupaten Badung, Propinsi Bali.

<sup>2</sup> Balai Besar Veteriner Denpasar, Jl. Raya Sesetan 266, Denpasar, Bali

## PENDAHULUAN

Produk susu fermentasi secara tradisional telah lama dikenal dan di konsumsi oleh masyarakat lokal di Indonesia, diantaranya *dadih* di Sumatera Barat (Sugitha, 1996; Sugitha, 2004), *dangke* di Sulawesi Selatan (Sirait, 1993 dalam Suryono, 2003) dan susu kuda liar Bima terfermentasi di Nusa Tenggara Barat (Hermawati dkk., 2004). Mikroba *indigenous* yang memegang peranan penting dalam proses fermentasi susu secara tradisional pada umumnya adalah bakteri asam laktat (Oberman, 1985; Aryanta, 1995).

Bakteri asam laktat (BAL) telah banyak digunakan untuk memfermentasi pangan dan dibuktikan bahwa BAL merupakan jenis bakteri yang aman digunakan dalam pangan (Rohim dan Soebijanto, 2002). Menurut Antara (2004) BAL adalah bakteri yang bermanfaat dan pada umumnya dipertimbangkan untuk meningkatkan mutu gizi pangan dan meningkatkan cita rasa pada pangan serta menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk. Beberapa spesies BAL telah dimanfaatkan dalam industri sebagai kultur starter maupun sebagai probiotik pada pangan yang berfungsi untuk meningkatkan kesehatan manusia (Goldin, 1998; Salminen dkk., 1998).

Eksplorasi BAL dari pangan terfermentasi asli Indonesia dan mengembangkannya sebagai probiotik akan dapat berperan dalam pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi. Penelitian sebelumnya telah diisolasi 6 kelompok (41 isolat) BAL *indigenous* dari susu kuda Bima terfermentasi. Representatif dari keenam kelompok tersebut teridentifikasi sebagai *Lactobacillus acidophilus* KBc, *Lb. salivarius* KBd, *Lb. brevis* KBa, *Lb. delbrueckii* KBe, *Lb. plantarum* KBb dan *Lactococcus lactis* KBf (Widiada dkk., 2006). Penelitian karakterisasi dan seleksi terhadap isolat BAL tersebut sebagai probiotik belum pernah dilakukan.

Untuk dapat dimanfaatkan sebagai probiotik, spesies BAL *indigenous* dari susu kuda liar Bima terfermentasi tersebut perlu dikaji potensinya melalui seleksi sebagai probiotik. Bakteri asam laktat dapat diterima sebagai probiotik harus memiliki karakteristik sebagai berikut: isolat BAL harus berasal atau diisolasi dari sumber yang jelas, tidak patogen, mempunyai ketahanan hidup (viabilitas) pada media dengan pH rendah, mampu tumbuh pada media yang mengandung garam empedu (*bile salt*) konsentrasi tinggi, mampu menempel (*adherent*) dan berkolonisasi pada sel epitel usus, mempunyai aktivitas antibakteri serta mempunyai efek yang menguntungkan untuk kesehatan (Goldin, 1998 ; Salminen dkk., 1998).

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk mengkarakterisasi spesies BAL *indigenous* yang diisolasi dari susu kuda liar Bima terfermentasi. Karakterisasi dilakukan mengarah pada karakteristik probiotik seperti sifat patogenitas,

ketahanan hidup pada pH rendah, kemampuan tumbuh pada garam empedu konsentrasi tinggi, kemampuan menempel dan berkolonisasi pada epitel mukosa usus, dan penurunan kadar kolesterol serum darah.

## METODE PENELITIAN

### Spesies Bakteri dan Hewan Coba

Spesies BAL *indigenous* yang diisolasi dari susu kuda Bima terfermentasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Lb. acidophilus* KBc, *Lb. salivarius* KBd, *Lb. brevis* KBa, *Lb. delbrueckii* KBe, *Lb. plantarum* KBb dan *Lc. lactis* KBf. Kultur induk (*stock cultures*) disimpan pada -80 °C dalam *glycerol deep*. Bakteri uji *Pasteurella multocida* tipe B<sub>2</sub> 322 dan *Streptococcus zooepidemicus* EPI 560 digunakan sebagai kontrol positif dalam uji patogenitas. Bakteri patogen yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri yaitu *Escherichia coli* ATCC8739, *Salmonella enteritidis* ATCC13076 dan *Streptococcus pyogenes* ATCC19615.

Untuk mengetahui kemampuan BAL menempel dan berkolonisasi pada permukaan sel-sel epitel mukosa usus digunakan mencit (*Mus musculus*). Untuk pengukuran kadar kolesterol serum darah digunakan kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jenis lokal umur  $\pm$  5 bulan (Kusumawati, 2004).

### Pembuatan Kultur Kerja Isolat BAL

Satu ose isolat BAL pada kultur stok (*stock cultures*) ditumbuhkan dalam media MRSA dengan metode goresan penuh, selanjutnya diinkubasi secara anaerob (10 % CO<sub>2</sub>) pada suhu 37 °C selama 48 jam. Koloni BAL yang tumbuh diperiksa kemurniannya dengan uji katalase, pewarnaan Gram dan pemeriksaan morfologi bakteri secara mikroskopis. Apabila koloni BAL sudah murni (tanpa kontaminasi) maka siap digunakan sebagai kultur kerja untuk uji-uji selanjutnya.

### Uji Patogenitas BAL secara *In Vivo* pada Mencit (*Mus musculus*)

Satu ose isolat BAL pada kultur kerja terlebih dahulu ditumbuhkan pada media BHI *broth* (Oxoid, CM225) kemudian diinkubasi secara aerob pada suhu 37 °C selama semalam. Bakteri asam laktat yang tumbuh pada BHI *broth* kemudian diperiksa kemurniannya dengan melakukan uji katalase, pewarnaan Gram dan dilanjutkan dengan pemeriksaan morfologi secara mikroskopis. Apabila sudah murni, isolat BAL dari pupukan pada BHI *broth* disuntikan pada 5 ekor mencit percobaan dengan dosis masing-masing 0,1 ml (10<sup>9</sup> cfu/ml) per ekor mencit secara intraperitoneal sebanyak satu kali. Kemudian dilanjutkan dengan pemberian BAL secara oral dengan dosis 0,1 ml (10<sup>9</sup> cfu/ml) per ekor mencit per hari selama 14 hari. Sebagai kontrol positif digunakan dua isolat

patogen yaitu *Pasteurella multocida* type B<sub>2</sub> 332 (Priadi dan Natalia, 2000) dan *Streptococcus zooepidemicus* EPI 560 (Dibia dkk., 1995a). Sebagai kontrol negatif, sebanyak 5 ekor mencit disuntikkan media BHI *broth* dengan dosis 0,1 ml per ekor mencit secara intraperitoneal. Pengamatan secara klinis terhadap mencit percobaan dilakukan setiap hari selama 14 hari.

Semua mencit percobaan yang mati dalam masa pengamatan dan yang masih hidup pada hari ke-15 di bunuh dan dilakukan bedah bangkai (nekropsi). Sampel organ hati, paru-paru, limpa, ginjal, dan jantung diambil secara aseptis untuk dilakukan isolasi kembali bakteri (reisolasi) yang disuntikkan sebelumnya dan membuktikan ada tidaknya invasi. Sebagian sampel organ hati, ginjal dan usus diambil dan dimasukkan ke dalam larutan fiksatif formalin buffer 10 % untuk diperiksa secara histopatologis dengan melihat perubahan patologi pada sel-sel organ hati, ginjal, dan usus akibat peradangan maupun toksik.

#### Uji Ketahanan BAL pada Media dengan pH Rendah

Satu ose isolat BAL yang diuji, dimasukkan ke dalam media cair GYP dengan pH yang berbeda tersebut, kemudian diinkubasi secara aerob pada suhu 37 °C masing-masing selama 2 jam, 3 jam, dan 4 jam. Pengamatan dilakukan dengan menumbuhkan kembali isolat BAL tersebut dalam MRSA pH 6,2 yang diinkubasi secara anaerob (10 % CO<sub>2</sub>) pada suhu 37 °C selama 48 jam. Apabila positif berarti ada pertumbuhan koloni BAL pada media yang diujikan.

#### Uji Kemampuan Tumbuh BAL pada Media yang Mengandung Garam Empedu

Dalam penelitian ini konsentrasi garam empedu yang digunakan sebagai media tumbuh adalah 0,750 %; 1,875 %; 3,750 %; 5,625 % dan 7,500 %. Sebelum isolat BAL diuji ketahanan terhadap garam empedu, terlebih dahulu dibuat media MRSA pH 6,2 dengan konsentrasi garam empedu disesuaikan dengan masing-masing perlakuan. Selanjutnya pada media tersebut ditumbuhkan satu ose isolat BAL yang diuji dengan metode gores, kemudian diinkubasi secara anaerob (10 % CO<sub>2</sub>) pada suhu 37 °C selama 48 jam. Apabila positif berarti ada pertumbuhan koloni BAL pada media yang diujikan (Fardiaz, 1989).

#### Uji Kemampuan BAL Menempel dan Berkolonisasi pada Usus Mencit

Pada penelitian ini digunakan mencit (*Mus musculus*) berumur 6 minggu sebagai hewan percobaan. Untuk pakan mencit selama penelitian ini digunakan pakan konsentrat standar 551 (Charoen Pokphand) dicampur dengan pisang kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit. Untuk air minum digunakan cairan infus (NaCl fisiologis). Demikian pula sekam (*litter*) yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dan diganti setiap hari.

Mencit percobaan sebelum digunakan diberikan antibakteri (Ampicol, Medion) dengan dosis 5 gram per liter air minum. Hal ini bertujuan untuk meniadakan BAL dalam usus tikus sebelum pengujian dilakukan. Air minum yang mengandung antibakteri diberikan *ad libitum* selama 3 hari. Pada hari ke empat feses tikus diambil secara aseptis dan sampel feses ditampung dengan tabung steril. Selanjutnya sampel feses dikultur pada media GYP. Koloni yang tumbuh diuji katalase, pewarnaan Gram dan pemeriksaan morfologi bakteri secara mikroskopis. Apabila tidak ada BAL yang tumbuh dan teridentifikasi berarti mencit negatif BAL dan mencit dapat digunakan dalam penelitian.

Isolat BAL yang dipilih adalah isolat BAL yang mempunyai karakteristik probiotik pada seleksi awal yaitu: (1) mempunyai nilai keamanan dalam pangan, (2) mampu bertahan hidup pada pH lebih rendah atau minimal sama dengan 2,5 selama minimal 2 jam, dan (3) mampu tumbuh pada media yang mengandung garam empedu (*bile salt*) dengan konsentrasi lebih tinggi atau sama dengan 0,75 %. Isolat BAL yang terpilih mula-mula ditumbuhkan pada media MRSA. Koloni yang tumbuh dipanen dengan NaCl fisiologis steril, kemudian inokulasikan pada 5 ekor mencit untuk masing-masing isolat. Dosis isolat BAL yang diberikan adalah 0,1 ml (10<sup>11</sup> cfu/ml) secara oral setiap hari selama 2 minggu. Setelah pemberian BAL terakhir (hari ke-14), feses ditampung setiap hari selama seminggu dan ditumbuhkan pada media GYP untuk isolasi dan identifikasi kembali BAL yang telah diinokulasikan. Pada hari ke-21, semua mencit dibunuh dan dinekropsi. Selanjutnya dilakukan upaya isolasi kembali (reisolasi) dan identifikasi BAL dari mukosa usus dan feses. Koloni bakteri yang tumbuh dan diindikasikan BAL diuji katalase, perwarnaan Gram dan pemeriksaan morfologi secara mikroskopis. BAL yang terisolasi dari kerokan mukosa usus dan feses hari ke 21, selanjutnya diidentifikasi dengan menggunakan kit API 50CH dan API 50CHL versi 5,0 yang mengandung 49 jenis gula dan turunannya.

#### Pengujian Efek BAL Terhadap Penurunan Kadar Kolesterol

Untuk mengetahui efek BAL terhadap penurunan kadar kolesterol serum darah dilakukan pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) (Kusumawati, 2004). Kelinci yang digunakan dengan berat badan rata-rata 1,5 kg dan dikelompokkan secara acak menjadi beberapa kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor. Kelompok perlakuan adalah kelompok kelinci dengan kondisi hiperkolesterolemia dan diberikan isolat BAL yang terseleksi pada masing-masing kelompok secara oral sebanyak 2 ml (10<sup>11</sup> cfu/ml) per ekor kelinci selama 4 minggu. Kelompok kontrol positif adalah kelompok kelinci dengan keadaan hiperkolesterolemia tanpa pemberian BAL. Sedangkan sebagai kelompok kontrol negatif adalah kelompok kelinci normal tanpa pemberian BAL. Perlakuan hiperkolesterolemia pada kelompok kelinci percobaan adalah dengan cara pemberian kuning telur ayam

sebanyak 6 ml/ ekor/hari secara oral selama 7 hari, sedangkan kelompok kelinci kontrol negatif tanpa diberikan kuning telur (Suarsana dkk., 2004).

Darah dari masing-masing kelinci untuk semua kelompok diambil setiap minggu selama 4 minggu setelah perlakuan pemberian BAL. Darah diambil melalui *vena auricularis* sebanyak 2 ml dan dimasukkan ke dalam tabung steril. Darah didiamkan menggumpal pada suhu kamar selama 4 jam sampai keluar serum. Serum dipisahkan dari darah dengan cara disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya serum disimpan pada suhu -20°C sampai dilakukan pengujian kadar kolesterol. Untuk pengujian kadar kolesterol serum darah digunakan kit komersial *Cholesterol liquicolor* (Human GmbH, cat.10017). Prosedur ujinya disesuaikan dengan protokol yang ada.

HASIL PENELITIAN

**Patogenitas Isolat Bakteri Asam Laktat**

Pengamatan secara klinis terhadap mencit percobaan yang diberikan isolat BAL *indigenus* pada masing-masing

kelompok dilakukan setiap hari selama 14 hari. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa selama 14 hari pemberian, tidak ditemukan mencit yang menunjukkan gejala klinis sakit atau mati. Demikian pula halnya pada kontrol negatif, tidak ditemukan mencit yang sakit atau mati namun pada kontrol positif seluruh mencit mati setelah hari ke-3 diberikan bakteri patogen (Tabel 1). Hasil pengujian juga menunjukkan BAL *indigenus* yang diisolasi dari susu kuda liar Bima tidak menginvasi hati, ginjal, paru-paru, jantung, dan limpa mencit percobaan. Hal ini dibuktikan dengan tidak terisolasinya kembali BAL yang telah diberikan selama 14 hari. Pengamatan histopatologis menunjukkan bahwa tidak ditemukan adanya perubahan patologi pada organ hati, ginjal dan usus dari mencit percobaan yang diberikan isolat BAL *indigenus* selama 14 hari berturut-turut. Pada kelompok mencit percobaan yang diberikan dua bakteri patogen (*Past. multocida* dan *Strep. zooepidemicus*) menunjukkan peradangan dengan infiltrasi sel netrofil, erosi villi, nekrosis sel epitel, kongesti dan ditemukan koloni bakteri pada jaringan hati.

Tabel 1. Keamanan BAL *indigenus* secara *in vivo* pada mencit (*Mus musculus*)

Kelompok	Status Mencit	Perubahan histopatologi	Reisolasi bakteri
Kontrol positif <i>Past. multocida</i>	M	Hati : kongesti, peradangan (infiltrasi sel netrofil), adanya koloni bakteri Ginjal : kongesti pada glomerulus Usus : erosi vili, peradangan (infiltrasi sel netrofil), dan nekrosis sel epitel	T
<i>Strep. zooepidemicus</i>	M	Hati : kongesti, peradangan (infiltrasi sel netrofil), adanya koloni bakteri Ginjal : kongesti pada glomerulus Usus : erosi vili, peradangan (infiltrasi sel netrofil), dan nekrosis sel epitel	T
Kontrol negatif	H	Normal, tidak ada peradangan	TT
<i>Lb. acidophilus</i> KBc	H	Normal, tidak ada peradangan	TT
<i>Lb. plantarum</i> KBb	H	Normal, tidak ada peradangan	TT
<i>Lb. salivarius</i> KBd	H	Normal, tidak ada peradangan	TT
<i>Lb. brevis</i> KBa	H	Normal, tidak ada peradangan	TT
<i>Lb. delbrueckii</i> KBe	H	Normal, tidak ada peradangan	TT
<i>Lc. lactis</i> KBf	H	Normal, tidak ada peradangan	TT

Keterangan: M= mati; H= hidup; T= terisolasi; TT= tidak terisolasi

**Ketahanan BAL pada Media dengan pH Rendah**

Indikator pH dan waktu yang digunakan untuk seleksi BAL sebagai probiotik adalah berdasarkan kondisi di dalam lambung manusia. Hasil pengujian ketahanan isolat BAL dari susu kuda liar Bima ditunjukkan pada Tabel 2. Berdasarkan

data tersebut, semua BAL *indigenus* tidak tahan hidup pada pH yang sangat rendah (pH 1,5). Pada media dengan pH 2,0 selama 2 jam dan 3 jam hanya *Lb. brevis* Kba yang dapat tahan hidup. Pada pH 2,5 selama 2 dan 3 jam yang tahan hidup adalah *Lb. acidophilus* KBc dan *Lb. brevis* Kba, sedangkan yang lainnya tidak tahan hidup.

Tabel 2. Ketahanan hidup BAL *indigenus* pada media dengan pH rendah

Ketahanan Hidup	Isolat BAL <i>indigenus</i>					
	<i>Lb. acidophilus</i> KBc	<i>Lb. salivarius</i> KBd	<i>Lb. brevis</i> Kba	<i>Lb. plantarum</i> KBb	<i>Lb. delbrueckii</i> KBe	<i>Lc. lactis</i> KBf
Pada pH 1,5						
2 jam	-	-	-	-	-	-
3 jam	-	-	-	-	-	-
4 jam						
Pada pH 2,0						
2 jam			+			
3 jam	-	-	+	-	-	-
4 jam	-	-	-	-	-	-
Pada pH 2,5						
2 jam	+	-	+	-	-	-
3 jam	+	-	+	-	-	-
4 jam	-	-	+	-	-	-

Keterangan : + = tumbuh - = tidak tumbuh

**Kemampuan Tumbuh BAL pada Media yang Mengandung Garam Empedu**

Pengujian kemampuan tumbuh isolat BAL secara *in vitro* pada media yang mengandung garam empedu (*bile salt*) didasarkan pada kondisi umum di dalam usus manusia. Secara keseluruhan, keenam isolat BAL *indigenus* dapat tumbuh

baik pada media yang mengandung garam empedu 0,750 % dan 1,875 %. Pada media dengan konsentrasi garam empedu 3,75 % *Lb. acidophilus* dan *Lb. brevis* masih dapat tumbuh, sedangkan BAL *indigenus* yang lain tidak dapat tumbuh. *Lb. acidophilus* mempunyai kemampuan tumbuh yang paling tinggi hingga konsentrasi 5,625 %, seperti ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Kemampuan tumbuh BAL *indigenus* pada media yang mengandung garam empedu

Konsentrasi garam empedu (%)	Isolat BAL <i>indigenus</i>					
	<i>Lb. plantarum</i> KBb	<i>Lb. acidophilus</i> KBc	<i>Lb. salivarius</i> K Bd	<i>Lb. brevis</i> Kba	<i>Lb. delbrueckii</i> KBe	<i>Lc. lactis</i> KBf
0,750	+	+	+	+	+	+
1,875	+	+	+	+	+	+
3,750	-	+	-	+	-	-
5,625	-	+	-	-	-	-
7,500	-	-	-	-	-	-

Keterangan : + = tumbuh - = tidak tumbuh

Tabel 4. Kemampuan bakteri asam laktat menempel dan berkolonisasi pada epitel usus mencit (*Mus musculus*)

Pengamatan hari ke	Reisolasi BAL <i>indigenus</i>			
	<i>Lb. acidophilus</i> KBc		<i>Lb. brevis</i> KBa	
	Feces	Dinding usus	Feces	Dinding usus
15	+	Td	+	td
16	+	Td	+	td
17	+	Td	+	td
18	+	Td	+	td
19	+	Td	+	td
20	+	Td	+	td
21	+	+	+	+

Keterangan : + = terisolasi kembali td = tidak dilakukan

**Kemampuan BAL Menempel dan Berkolonisasi pada Epitel Mukosa Usus Mencit (*Mus musculus*)**

Kemampuan isolat BAL menempel dan berkolonisasi dilakukan secara *in vivo* pada mencit, dengan indikator terisolasinya kembali BAL yang sama. Hasil pengujian menunjukkan bahwa *Lb. acidophilus* KBc dan *Lb. brevis* KBa dapat diisolasi kembali dari feces dan dinding mukosa usus pada hari ke-21 atau 7 hari setelah pemberian BAL tersebut berakhir (Tabel 4). Setelah dilakukan identifikasi dengan menggunakan kit API 50CH dan API 50CHL versi 5,0 diperoleh bahwa spesies BAL reisolasi adalah sebagai berikut: (1) *Lb. brevis* KBa dengan katagori identifikasi baik (97,6 %) dan (2) *Lb. acidophilus* KBc dengan katagori identifikasi baik (95,4 %).

**Penurunan Kadar Kolesterol Total Serum Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)**

Pengaruh pemberian BAL *indigenus* selama dari susu kuda liar Bima selama 4 minggu terhadap kadar kolesterol total serum kelinci dapat dilihat pada Tabel 5. *Lb. acidophilus* KBc dan *Lb. brevis* Kba mampu menurunkan kadar kolesterol total serum kelinci pada keadaan hiperkolesterolemia secara nyata ( $P < 0,05$ ) masing-masing sebesar 53,74 % dan 51,70 % dibandingkan dengan kelompok kontrol hiperkolesterolemia yang tidak diberikan perlakuan dengan BAL .

Tabel 5. Kadar kolesterol total serum darah kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)

Perlakuan	Kadar kolesterol (mg/dl) berdasarkan waktu					
	SP	HK	M1	M2	M3	M4
KN	35,7 <sup>a</sup>	35,3 <sup>a</sup>	34,3 <sup>a</sup>	33,3 <sup>a</sup>	34,0 <sup>a</sup>	36,0 <sup>a</sup>
KP	37,3 <sup>b</sup>	303,3 <sup>a</sup>	294,7 <sup>a</sup>	289,0 <sup>a</sup>	284,0 <sup>a</sup>	280,7 <sup>a</sup>
LA	36,0 <sup>c</sup>	278,0 <sup>a</sup>	255,3 <sup>ab</sup>	218,3 <sup>bc</sup>	171,3 <sup>cd</sup>	128,7 <sup>d</sup>
LB	29,7 <sup>d</sup>	296,7 <sup>a</sup>	260,7 <sup>a</sup>	195,7 <sup>b</sup>	158,0 <sup>b</sup>	143,3 <sup>c</sup>

Keterangan:

- KN (kontrol tanpa perlakuan); KP (kontrol dengan hiperkolesterol); LA (perlakuan dengan hiperkolesterol dan pemberian *Lb. acidophilus* KBc); LB (perlakuan dengan hiperkolesterol dan pemberian *Lb. brevis* KBa); SP (sebelum perlakuan); HK (perlakuan hiperkolesterol); M (minggu).
- Nilai dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ), sedangkan nilai dengan huruf yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ )

**PEMBAHASAN**

**Keamanan Isolat Bakteri Asam Laktat**

Upaya peningkatan keamanan pangan adalah dalam rangka perlindungan terhadap konsumen. Untuk itu, setiap penelitian yang terkait pangan, harus menerapkan prinsip *zero risk* dalam aspek keamanan pangan khususnya terhadap efek infeksi sistemik oleh mikroba patogen. Berbagai aspek keamanan dari BAL dapat dilakukan uji secara *in vivo* dengan menggunakan hewan percobaan serta uji klinis secara langsung pada manusia yang bertujuan untuk mengetahui bahwa isolat BAL yang diuji tidak bersifat patogen, tidak invasif (*non invasive*) dan tidak toksik (*non toxic*) (Winarno, 1997).

Berdasarkan Tabel 1, pengamatan secara klinis terhadap mencit percobaan yang diberikan isolat BAL *indigenus* selama 14 hari menunjukkan bahwa tidak ditemukan mencit yang menunjukkan gejala klinis sakit atau mati. Dari uji keamanan BAL menunjukkan pula bahwa tidak ada BAL *indigenus* yang diisolasi dari susu kuda liar Bima yang menginvasi hati, ginjal, paru-paru, jantung dan limpa mencit percobaan. Disamping itu, berdasarkan data pengamatan histopatologi, tidak ditemukan adanya perubahan patologi pada organ hati, ginjal dan usus dari mencit percobaan yang diberikan isolat BAL *indigenus*. Hal ini membuktikan bahwa BAL *indigenus* yang diisolasi dari susu kuda liar Bima aman untuk dikonsumsi. Hasil penelitian ini mendukung pendapat dari beberapa hasil penelitian sebelumnya. Menurut Oberman (1985) dan Aryanta (1995) mikroba *indigenus* yang memegang peranan penting dalam proses fermentasi susu secara tradisional pada umumnya adalah bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat telah banyak digunakan untuk memfermentasi pangan dan dibuktikan bahwa BAL merupakan jenis bakteri yang aman digunakan dalam pangan (Rohim dan Soebijanto, 2002). Pendapat serupa dikemukakan oleh Antara (2004) yang menyatakan bahwa BAL adalah bakteri yang bermanfaat dan pada umumnya dipertimbangkan untuk meningkatkan mutu gizi pangan (*food grade*) dan meningkatkan cita rasa (*flavor*) pada pangan serta menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk. Beberapa spesies BAL telah dimanfaatkan dalam industri sebagai kultur starter maupun sebagai probiotik pada pangan yang berfungsi

untuk meningkatkan kesehatan manusia (Goldin, 1998; Salminen dkk., 1998). *Lactobacillus acidophilus* digunakan sebagai kultur starter dalam pembuatan kefir (Gilmour dan Rowe, 1981) dan *acidophilus milk* (Oberman, 1985; Aryanta, 1995). *Lactobacillus plantarum* dan *Lb. brevis* berperan dalam pembuatan produk ikan terfermentasi tradisional seperti *balao-balao* serta dalam pembuatan produk sayuran terfermentasi seperti *sauerkraut*, *pikel* dan *kimchi* (Aryanta, 1995).

### Ketahanan BAL pada Media dengan pH Rendah

Berdasarkan karakteristik ketahanan hidup BAL pada media pH rendah yang bervariasi seperti yang terlihat pada Tabel 2, menunjukkan bahwa pada pH 2,0 selama 2 jam dan 3 jam *Lb. brevis* Kba masih mampu bertahan hidup, sedangkan *Lb. acidophilus* KBc mempunyai ketahanan hidup pada pH 2,5 selama 2 jam dan 3 jam. *Lb. brevis* Kba lebih tahan terhadap asam dan pada pH 2,5 mampu bertahan hidup selama 4 jam. Menurut Wilson dan Miles (1966), media dengan pH yang rendah bersifat toksik dan menyebabkan kematian bakteri. Utama (2001) menyatakan bahwa stabilitas pH sangat penting untuk menjamin berlangsungnya reaksi kimia yang berkesinambungan dalam sistem biologi sel. Bila sel bakteri terpapar pada kondisi yang sangat asam, maka membran sel dapat mengalami kerusakan sehingga mekanisme transpor zat-zat melalui membran sel menjadi terganggu dan berakibat pada hilangnya komponen-komponen intraseluler.

Berdasarkan seleksi ini, *Lb. acidophilus* KBc dan *Lb. brevis* Kba yang diisolasi dari susu kuda Bima mempunyai ketahanan yang baik terhadap kondisi asam, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai kandidat probiotik. Hasil penelitian ini mendukung hasil penelitian serupa yang pernah dilaporkan oleh Chan dkk. (2005), Reksohadwinoto dkk. (2005) dan Kusumaningtyas dkk. (2005). Chan dkk. (2005) menyatakan bahwa *Lb. gasseri* B38T38 tahan hidup pada media dengan pH 2,0 selama 2 jam yang diinkubasi pada suhu 37°C dan hasil seleksi BAL yang dilakukan oleh Reksohadwinoto dkk. (2005) menunjukkan bahwa BAL strain *Lb. acidophilus* MKD0304 dan *Bifidobacterium bifidum* TMP0204 tahan terhadap perlakuan variasi pH 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 dan 5,0 dengan waktu inkubasi hingga 4 jam. Demikian halnya hasil penelitian Kusumaningtyas dkk. (2005) menunjukkan bahwa strain-strain BAL *Lb. casei* FNCC262, *Lb. acidophilus* FNCC116, isolat KL-3, isolat Da-1, dan isolat Db-2 mampu bertahan hidup pada pH 2,5.

### Kemampuan Tumbuh BAL pada Media yang Mengandung Garam Empedu

Pertumbuhan spesies BAL *indigenus* pada media MRSA yang mengandung garam empedu 0,750 % dan 1,875

% seperti pada Tabel 3 menunjukkan *Lb. plantarum* KBb, *Lb. acidophilus* KBc, *Lb. salivarius* KBd, *Lb. delbrueckii* KBe, *Lb. brevis* Kba, dan *Lc. Lactis* KBF masih dapat tumbuh dengan baik. Berdasarkan penelitian ini, *Lb. acidophilus* KBc masih mampu tumbuh pada media yang mengandung garam empedu hingga konsentrasi 5,625 % dan disusul *Lb. brevis* Kba dengan kemampuan tumbuh pada media yang mengandung garam empedu lebih rendah yaitu 3,750 %. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Nishida dkk. (2005) yang menyatakan bahwa *Lb. paracasei* KW3110 mempunyai kemampuan tumbuh pada media MRS broth yang mengandung 2 % garam empedu. Hasil penelitian ini mendukung pendapat Suriawiria (1983) bahwa BAL yang pola fermentasinya homofermentatif mempunyai sifat toleransi yang baik terhadap konsentrasi garam yang tinggi dan pertumbuhannya pada konsentrasi garam yang tinggi tersebut masih tetap baik. Menurut Widodo (2003), BAL probiotik mempunyai enzim dengan aktivitas menghidrolisa garam empedu (*bile salt hydrolase*, BSH). Enzim ini mampu mengubah kemampuan fisiko-kimia yang dimiliki oleh garam empedu, sehingga tidak bersifat toksik bagi bakteri tersebut.

Berdasarkan kemampuan tumbuh pada media dengan konsentrasi garam empedu lebih besar atau sama dengan 0,750 %, spesies BAL *indigenus* yang diisolasi dari susu kuda liar Bima tersebut dapat dimanfaatkan sebagai bakteri probiotik.

### Kemampuan Berkolonisasi dan Menempel pada Epitel Mukosa Usus

Bakteri asam laktat hasil seleksi yang terpilih sebagai kandidat probiotik (*Lb. acidophilus* KBc dan *Lb. brevis* Kba) akan lebih efektif apabila mampu menempel pada sel epitel usus. Menurut Rohim dan Soebijanto (2002) penempelan bakteri pada sel epitel usus bersifat spesifik dan reversibel (tetap) serta merupakan langkah awal dalam proses kolonisasi bagi bakteri. Uji kemampuan isolat BAL menempel dan berkolonisasi dilakukan secara *in vivo* pada mencit dengan indikator terisolasinya kembali BAL yang sama setelah diidentifikasi lebih lanjut dengan menggunakan kit identifikasi standar API 50CH dan API 50 CHL medium.

Hasil pengujian ini menunjukkan bahwa *Lb. acidophilus* KBc dan *Lb. brevis* Kba dapat diisolasi kembali dari feses dan dinding mukosa usus pada hari ke-21 atau 7 hari setelah pemberian BAL tersebut berakhir, seperti terlihat pada Tabel 5. Secara kualitatif, hasil ini membuktikan bahwa kedua isolat BAL terseleksi tersebut mempunyai kemampuan menempel dan berkolonisasi pada epitel mukosa usus mencit. Ouwehand dkk. (2002) menyatakan bahwa kemampuan menempel BAL pada epitel mukosa usus adalah salah satu kriteria utama seleksi terhadap BAL yang digunakan sebagai probiotik. Bakteri asam laktat yang tidak dapat menempel maka

akan hanyut oleh lendir dan cairan lain yang terdapat pada permukaan mukosa usus akibat gerakan peristaltik usus.

Adanya kemampuan menempel dan berkolonisasinya BAL *indigenus* kemungkinan akibat adanya reseptor spesifik pada sel inang dan sifat hidrofobik sel bakteri. Proses penempelan bakteri pada reseptor di permukaan sel inang diperantarai oleh glikoprotein permukaan membran sel epitel usus dengan komponen struktural dinding sel bakteri yaitu asam lipoteikoat (Utama, 1998). Rohim dan Soebijanto (2002) menyatakan bahwa dalam satu sel epitel mukosa usus terdapat hingga  $8,3 \times 10^8$  reseptor untuk asam lipoteikoat (ALT). Asam lipoteikoat dinding sel bakteri Gram positif menentukan pula sifat hidrofobik sel bakteri. Kemampuan menempel BAL pada sel inang yang berkaitan dengan sifat hidrofobik permukaan sel BAL telah diteliti pada *S. mutan* dan *S. salivarius*. Semakin hidrofobik permukaan sel bakteri kemampuan perlekatannya pada sel inang semakin tinggi (Utama, 1998).

#### Penurunan Kadar Kolesterol Total Serum Kelinci (*Orytolagus cuniculus*)

Kadar kolesterol total serum darah kelinci pada semua kelompok yang diberi perlakuan hiperkolesterolemia dengan pemberian kuning telur 6 cc/ekor/hari menunjukkan kadar yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (KN) sebagai kelompok non-hiperkolesterolemia. Hal ini menunjukkan bahwa kelinci tersebut telah menderita hiperkolesterolemia (Kusumawati, 2004). Pemberian BAL *indigenus* dari susu kuda liar Bima terfermentasi berpengaruh terhadap penurunan kadar kolesterol total serum darah kelinci. *Lb. acidophilus* KBc dan *Lb. brevis* Kba mampu menurunkan kadar kolesterol serum darah kelinci pada keadaan hiperkolesterolemia secara nyata ( $P < 0,05$ ) masing-masing sebesar 53,74 % dan 51,70 % setelah 4 minggu diberi BAL dibandingkan dengan kelompok kontrol hiperkolesterolemia yang tidak diberikan perlakuan dengan BAL. Hasil ini memperkuat hasil-hasil penelitian sebelumnya tentang aplikasi probiotik BAL pada berbagai produk yang mampu menurunkan kadar kolesterol. Menurut Harmayani (2004), beberapa isolat probiotik BAL dan produk makanan probiotik seperti *yoghurt* dapat menurunkan kadar kolesterol serum darah. Sejalan dengan ini menurut Djide (2005), susu kedelai yang difermentasi *Lb. casei* subsp. *casei* R-35 dan *S. thermophilus* mempunyai efek pengikatan kolesterol secara *in vitro* sebesar 43,4 %. Penelitian lain menyatakan bahwa penurunan kolesterol oleh bakteri *Lb. bulgaricus* dapat mencapai 27-38 % (Legowo, 2002; Mulyanto, 2004). Sugitha dkk. (1999) melaporkan bahwa bila mengkonsumsi dadih yang mengandung *Lb. acidophilus* sebanyak 210 ml setiap hari selama 42 hari mampu menurunkan kadar kolesterol darah hingga 71,75 %. Menurut Harmayani (2004), *Lactobacillus sp.*

Dad13 yang diisolasi dari dadih dan diskriming secara *in vivo* pada hewan coba tikus *Sprague Dawley* mampu menurunkan kadar kolesterol serum darah sebesar 42 %. Demikian pula halnya Chan dkk. (2005) melaporkan hasil penelitiannya yang menyatakan bahwa *Lb. gasseri* B38T38 dapat mengasimilasi kolesterol hingga 42,9 %. Suarsana dkk. (2004), menyatakan bahwa *yoghurt* yang mengandung *Lb. bulgaricus* dan *S. thermophilus* mampu menurunkan kadar kolesterol total serum darah kelinci dalam keadaan hiperkolesterolemia sebesar 40,4 %.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Sebanyak enam spesies BAL *indigenus* (*Lactobacillus acidophilus* KBc, *Lb. brevis* Kba, *Lb. plantarum* KBb, *Lb. salivarius* KBd, *Lb. delbrueckii* Kbe dan *Lactococcus lactis* KBf) dari susu kuda Bima dinyatakan aman untuk dikonsumsi dan mampu tumbuh pada media yang mengandung garam empedu 0,750 %, namun hanya *Lb. brevis* Kba dan *Lb. acidophilus* KBc yang mempunyai ketahanan hidup pada pH 2,5 minimal selama 2 jam. Kedua spesies BAL *indigenus* dari susu kuda liar Bima hasil seleksi (*Lb. brevis* Kba dan *Lb. acidophilus* KBc) yang diuji secara *in vivo* pada mencit mempunyai kemampuan menempel dan berkolonisasi pada epitel mukosa usus, disamping itu mempunyai aktivitas antibakteri yang tergolong lemah sampai dengan moderat. Kedua spesies BAL tersebut mampu menurunkan kadar kolesterol total serum kelinci pada keadaan hiperkolesterolemia secara nyata berturut-turut sebesar 53,74 % dan 51,70 %. *Lactobacillus acidophilus* KBc dan *Lb. brevis* Kba memenuhi persyaratan seleksi dan dapat digunakan sebagai bakteri probiotik, sedangkan yang lainnya tidak memenuhi persyaratan.

### Saran

Untuk memperkaya khasanah pengetahuan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap BAL *indigenus* (*Lb. acidophilus* KBc dan *Lb. brevis* Kba) yang diisolasi dari susu kuda liar Bima terfermentasi secara molekuler dan pemanfaatannya serta aplikasinya sebagai probiotik untuk produk susu maupun pangan lainnya.

## DAFTAR PUSTAKA

Antara, N.S. (2004). *Isolation and Identification of Indigenus Lactic Acid Bacteria, Their Role and Application in Production of Urutan, A Balinese Fermented Sausage*. Disertasi. Laboratory of Applied Microbiology, Department of Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

- Aryanta, W.R. (1995). *Peranan Bakteri Asam Laktat dalam Industri Pengolahan Bahan Pangan. Pidato Pengenalan Jabatan Guru Besar Tetap dalam Bidang Mikrobiologi Pangan pada Program Studi Teknologi Pertanian Universitas Udayana*. Disampaikan dalam Rapat Senat Terbuka UNUD Denpasar, 27 Oktober 1995.
- Dibia, N., Soeharsono dan Dartini, N.L. (1995). Keganasan isolat *Streptococcus zooepidemicus* pada kera, mencit dan babi. Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner, 7 – 8 Nopember 1995, Bogor.
- Djide, M.N. (2005). Pengaruh formulasi granul kedelai terfermentasi terhadap bakteri asam laktat dan pengikatan kolesterol secara *invitro*. *9<sup>th</sup> National Congress of Indonesian Society for Microbiology & 3<sup>rd</sup> Asian Conference for Lactic Acid Bacteria*. August 25-26, 2005, Bali.
- Fardiaz, S. (1989). *Petunjuk Laboratorium Mikrobiologi Pengolahan Pangan*. PAU-IPB, Bogor.
- Goldin, B.R. (1998). *Health Benefit of Probiotic*. Department of Family Medicine and Community Health, Boston.
- Harmayani, E. (2004). Peranan probiotik untuk menurunkan kolesterol. *Seminar Nasional Probiotik dan Prebiotik sebagai Makanan Fungsional*, 30 Agustus 2004, Denpasar.
- Kusumaningtyas, R.W., Susanti, I. dan Illaningtyas, F. (2005). Selection of lactic acid bacteria isolates for probiotics. *9<sup>th</sup> National Congress of Indonesian Society for Microbiology & 3<sup>rd</sup> Asian Conference for Lactic Acid Bacteria*. August 25-26, 2005, Bali.
- Kusumawati, D. (2004). *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Nishida, S., Inoue, S., Fujii, T., Nkajima, K., Fujiwara, D. dan Iino, H. (2005). The Selection of *Lactobacillus paracasei* strain KW3110 having antiallergy effect, confirmation of antiallergy effect in the animal model, and evaluation of the character as a probiotic. *9<sup>th</sup> National Congress of Indonesian Society for Microbiology & 3<sup>rd</sup> Asian Conference for Lactic Acid Bacteria*. August 25-26, 2005, Bali.
- Oberman, H. (1985). Fermented milks. In: *Microbiology of Fermented Foods*. Vol. 1. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., Tolkkko, S., Roberts, P., Ovas-ka, J. dan Salminen, E. (2002). Resected human colonic tissue: New models for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Journal of Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **9**: 184-186.
- Priadi, A. dan Natalia, L. (2000). Patogenesis *Septicaemia Epizootica* (SE) pada sapi/kerbau: Gejala klinis, perubahan patologis, reisolasi, deteksi *Pasteurella multocida* dengan media kultur dan *polymerase chain reaction* (PCR). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* **5**: 65-71.
- Reksohadiwinoto, B.S., Sugama, Y. dan Zakiyah, U.Y. (2005). Penelitian, pengembangan dan aplikasi probiotik pro-Chick LAB pada peternakan ayam. *9<sup>th</sup> National Congress of Indonesian Society for Microbiology & 3<sup>rd</sup> Asian Conference for Lactic Acid Bacteria*. August 25-26, 2005, Bali.
- Rohim, A. dan Soebijanto. (2002). Probiotik dan Flora Normal Usus. *Dalam: Ilmu Penyakit Anak*. (Editor: Soegianto, S.). Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y. dan Gorbach, S.L. (1998). Lactic acid bacteria in health and disease. *Dalam: Salminen, S. dan von Wright, A. (Eds.). Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Suarsana, N., Suartini, G.A.A. dan Utama, I.H. (2004). Pengaruh yoghurt terhadap kadar kolesterol total dan profil lipoprotein serum kelinci. *Jurnal Veteriner* **5**:14-19.
- Sugitha, I.M. (1996). Dadih: Olahan susu kerbau, manfaat, kendala dan prospeknya dalam era industrialisasi. *Jurnal Peternakan dan Lingkungan* **2**: 31-38.
- Sugitha, I.M. (2004). Ability of dadih as probiotic supplement for supporting health care at rural communities of West Sumatra. *International Symposium Probiotic for Human and Immunity*, September 7-8, 2004, Bali.
- Suriawiria, U. (1983). Pengawetan ikan secara biologis dan peranan bakteri laktat di dalamnya. *Dalam: Suharno J., Robert, U. dan Usman C.W. (eds.). Mikrobiologi di Indonesia*. Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia, Jakarta.
- Utama, I.H. (2001). *Pengantar Kimia Biofisika*. UPT Penerbit Universitas Udayana, Denpasar.
- Widiada, G.N., Antara, N.S. dan Aryanta, W.R. (2006). Identifikasi dan suksesi pertumbuhan bakteri asam laktat dalam susu kuda liar Bima selama penyimpanan. *Pertemuan Ilmiah Tahunan PERMI*, 25-27 Agustus 2006. Solo.
- Widodo. (2003). *Bioteknologi Industri Susu*. Lacticia Press, Yogyakarta.
- Wilson, G.S. dan Miles, A.A. (1966). *Principles of Bacteriology and Immunity*. Vol. 1 5th Edition. Butler & Tanner Ltd., London.
- Winarno, F.G. (1997). Probiotik dan keamanan pangan. *Seminar Nasional Biopreservasi dan Probiotik Dalam Industri Pangan*, 12 Juni 1997, Yogyakarta.