

JRL	Vol.8	No.1	Hal. 43 - 57	Jakarta, Maret 2012	ISSN : 2085.3866 No.376/AU1/P2MBI/07/2011
-----	-------	------	--------------	------------------------	--

UJI HAYATI *IN VITRO* MSA(*MANNOSE SPECIFIC ADHESIN*) DARI PROBIOTIK *Lactobacillus* sp. DAN EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH MANGGIS (*Garcinia mangostana* L.) DENGAN MENGGUNAKAN SEL MODEL *Saccharomyces cerevisiae*

Yulinery*, T., S. S. Nurina dan N.Nurhidayat

Bidang Mikrobiologi, P2B LIPI
Jl.Raya Bogor Jakarta km 46 Cibinong. E-mail: tyulinery@yahoo.co.id

Abstrak

Penyakit infeksi merupakan ancaman bagi kelangsungan hidup manusia. Penelitian mengenai pencegahan penyakit infeksi sangatlah penting. Penelitian ini merupakan penelitian awal dalam mengidentifikasi adanya aktivitas MSA (*Mannose-specific Adhesin*). Hasil uji In Vitro MSA (*Mannose-specific Adhesin*) dari probiotik *Lactobacillus* sp. yang diisolasi dari buah manggis (*Garcinia mangostana* L) dan ekstrak etanol kulit buah manggis dengan menggunakan sel model *Saccharomyces cerevisiae* menunjukkan bahwa terdapat bakteri *Lactobacillus* sp. asal buah manggis sebanyak 20 isolat, 11 dari isolat *Lactobacillus* tersebut berpotensi sebagai probiotik dan terdapat keanekaragaman aktivitas MSA. Dari 11 isolat didapat 4 isolat probiotik yaitu TM1, BST1, BST2, dan BST5, menunjukkan aktivitas MSA yang lebih besar yaitu, antara rentang jumlah rata-rata penggumpalan pada pengenceran tertinggi 9,6-11,8. Aktivitas MSA ditunjukkan dengan adanya pengurangan penggumpalan antara jumlah penggumpalan sebelum ditambah *D-manosa* dengan jumlah penggumpalan setelah penambahan *D-manosa*. Aktivitas penggumpalan terbesar ditunjukkan oleh *Lactobacillus* TM1 dan aktivitas penggumpalan yang terkecil ditunjukkan oleh *Lactobacillus* BST7. Dalam metode ini ekstrak etanol kulit manggis tidak terdeteksi mengandung MSA

kata kunci: *mannose-specific adhesin* (MSA), probiotik, *Saccharomyces cerevisiae*

IN VITRO TEST OF MANNOSE SPECIFIC ADHESIN (MSA) of *Lactobacillus* sp. AND ETHANOL EXTRACT OF SKIN FRUIT *Garcinia mangostana* L. BY USING *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

*Infection disease is a threat for human life. Research on preventing infection disease is very important. The aim this research was to improve the preventing of infection disease. This research was the basic on identification of MSA activity. The in vitro result of MSA which was isolated from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) and the extract of the fruit skin by using *Saccharomyces cerevisiae*. The result showed that there were 11 isolates of potential *Lactobacillus*, that have variation in MSA activities. Four isolates of them showed that the higher activities between 9.6-11.8 were TM1, BST1, BST2, and BST5. The MSA activities showed by reducing coagulation after adding D-Mannose. The highest activities showed by isolate TM1, and the lowest showed by isolate BST7. By using this method it is clearly found that the skin fruit not contain MSA*

keywords : *mannose-specific adhesin (MSA), probiotic, *Saccharomyces cerevisiae*.*

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Penyakit infeksi banyak ditemukan di masyarakat terutama infeksi usus seperti diare. Dalam setahun dilaporkan terdapat 20-50 penderita diare per seratus penduduk. Hal ini terjadi karena proses perlekatan mikroorganisme patogen pada sel inang, invasi sel dan jaringan inang serta toksigenitas. Interaksi tersebut diperantarai oleh komponen spesifik dari dinding sel mikroorganisme, yaitu adhesin dan reseptor sel inang (Brooks *et al.* 2008). Salah satu cara alternatif untuk mengatasi penyakit infeksi adalah dengan menurunkan pertumbuhan bakteri patogen dan memperbaiki keseimbangan mikroflora usus. Heyne (1987) melaporkan bahwa secara tradisional masyarakat telah lama menggunakan kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) untuk mengobati diare yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli*. Didukung oleh penelitian Johanna (2000) bahwa ekstrak etanol kulit buah manggis dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Namun penelitian mengenai mekanisme penghambatan pertumbuhan bakteri *E. coli* berupa pelekatan spesifik manosa pada ekstrak etanol kulit manggis tersebut belum dilaporkan.

Selain pengobatan secara tradisional, masalah penyakit infeksi dapat menggunakan probiotik. Probiotik adalah *food supplement*, mikroba hidup yang memberi pengaruh pada saluran pencernaan dan mengobati kondisi patologis (Fuller, 1992; Rolfe, 2000). Probiotik banyak digunakan untuk diare (Donaldson, 2004), dengan cara mengaktifkan sel-sel kekebalan, memperbaiki mikroflora usus dan menekan pertumbuhan bakteri patogen dengan cara pengenalan dan penempelan pada permukaan sel epitel yang sama pada saluran pencernaan. Salah satu strain probiotik, yakni *Lactobacillus* sp dapat melekat pada sel bakteri patogen dan teraglutinasi (Vrese and Marteau, 2007) sehingga merangsang sistem imun (Pretzer

et al., 2005), menstimulasi pertumbuhan mikroflora normal dan memproduksi substansi bakteriosid. Habitat *Lactobacillus* tersebar dan banyak ditemukan pada sayuran, biji-bijian dan produk susu (Adams and Moss, 2000; Hidayat *et al.* 2006). Dalam penelitian ini dikembangkan probiotik yang diisolasi dari buah lokal Indonesia. Salah satunya buah manggis, yang mendapat julukan *Queen of tropical fruit* (ratunya buah-buahan tropik) karena mengandung 19,8 gram karbohidrat per 100 gram buah yang terdiri dari gula sakarosa, dekstrosa dan levulosa (Verheij and Coronel, 1997).

Salah satu mekanisme yang diteliti mengenai penghambatan pertumbuhan mikroorganisme patogen oleh *Lactobacillus* yaitu, *Mannose-Specific Adhesin* (MSA) atau pelekat spesifik manosa yaitu protein ekstraseluler berupa adhesin yang spesifik terhadap reseptor manosa. Bakteri probiotik ini memiliki kemampuan untuk berkoloni di dalam saluran intestinal dan menghasilkan MSA untuk melekatkan dan mengumpulkan patogen-patogen di permukaan usus dan mencegahnya menempel pada reseptor spesifik manosa pada permukaan epitel usus (Adlerberth *et al.* 1996). Pretzer *et al.* (2005) melaporkan bahwa *Lactobacillus* mempunyai kemampuan untuk berikatan dengan manosa seperti virus immunodefisiensi manusia tipe 1 dan *Candida albicans*. Hal ini dapat juga diterapkan pada bakteri patogen yang mempunyai kandungan manosa pada dinding selnya (Brooks *et al.*, 2008). Mekanisme probiotik dalam pelekatan spesifik manosa dapat dilihat dalam penghambatan terjadinya infeksi usus yang disebabkan oleh bakteri patogen, seperti enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Pada permukaan sel ETEC terdapat pili yang membantu memperantai pelekatan bakteri pada reseptor sel epitel yang mengandung manosa (Adlerberth, 1996; Brooks, 2008). Probiotik berkompetisi dengan ETEC saat proses penempelan sehingga menghambat ETEC mengenali lokasi penempelannya pada epitel usus. Permukaan sel epitel yang

mengandung manosa juga berperan sebagai target perlekatan bakteri patogen lain, seperti *Salmonella enterica serovar Enteriditis*, *Vibrio cholerae*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Pretzer et al., 2005).

Beberapa bakteri probiotik diketahui dapat menghasilkan MSA diantaranya *Lactobacillus plantarum*, mampu mengumpulkan patogen-patogen yang terdapat di dalam saluran instestinal dan mencegahnya menempel pada reseptor spesifik manosa di permukaan epitel usus (Pretzer et al. 2005). Di sepanjang usus halus, membran mukosa diliputi oleh vilus. Ujung bebas sel-sel epitel vilus dibagi menjadi mikrovili yang diselubungi oleh glikokaliks, lapisan amorf yang kaya akan gula netral seperti manosa, arabinosa, galaktosa, ramnosa dan gula amino (Ganong, 2004). *Lactobacillus plantarum* dapat ditemukan dalam buah, sayuran, susu fermentasi, daging dan saluran pencernaan manusia (Boekhorst, 2006).

Pada beberapa spesies bakteri tertentu, terutama bakteri patogen proses hidrolisis dinding sel gram positif akan menghasilkan gula netral seperti manosa, ramnosa, arabinosa, dan glukosamin. Pada bakteri gram negatif, lipopolisakarida pada dinding selnya tersusun atas lipid kompleks yang disebut lipid A, yang padanya melekat sebuah polisakarida yang terbentuk dari sebuah inti dan sebuah rangkaian terminal dari unit yang berulang. Unit yang berulang ini terdiri dari manosa, ramnosa dan galaktosa. Dari penjelasan ini, dapat dikatakan bahwa hal ini juga dapat diaplikasikan oleh *Lactobacillus* sp untuk melekatkan manosa yang terdapat pada dinding sel bakteri, sehingga bakteri patogen tersebut dapat teragglutinasi. Hal ini sesuai dengan mekanisme dari *Lactobacillus* sp dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen yaitu dengan cara mengagglutinasi bakteri (Brooks, 2008)

Aktivitas MSA pada bakteri dapat diketahui melalui uji aglutinasi dengan menggunakan sel model *Saccharomyces*

cerevisiae (Zimmermann and Entian, 1996). Dengan menggumpalnya *S. cerevisiae* maka penggumpalan tersebut dapat dihambat oleh D-mannose, sehingga dapat diketahui bahwa bakteri tersebut mengandung adhesin yang spesifik terhadap reseptor manosa (Adlerberth, 1996). *Saccharomyces cerevisiae* merupakan khamir yang paling banyak berperan pada perkembangan mikrobiologi, biokimia dan genetika sehingga telah menjadi model organisme untuk molekuler genetika dan biologi sel. Khamir ini relatif aman digunakan dan mudah dikembangkan, berbentuk bulat, oval / memanjang, dan ukurannya 5-20 mm (5-10 mm x lebih besar dari bakteri). Komponen dinding selnya menurut Fardiaz (1997) terdiri dari glukukan khamir sebanyak 30-35% dari berat kering dinding selnya, Mannan (30%), protein (6-8%), khitin (8,5%) dan lipid (13,5%).

Dalam saluran pencernaan, bakteri patogen yang telah dikumpulkan akan lebih cepat difagositosis oleh makrofag. Fagositosis merupakan mekanisme pertahanan non-spesifik selular tubuh, yaitu proses penelanan mikroorganisme patogen, sehingga proses ini dapat mencegah timbulnya infeksi (Baratawidjaja, 2004).

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas MSA (*Mannose-Specific Adhesin*) dengan pengujian aglutinasi menggunakan sel model *Saccharomyces cerevisiae* dari probiotik *Lactobacillus* sp yang terseleksi dan ekstrak etanol kulit buah manggis, sehingga memberikan informasi ilmiah mengenai potensi buah manggis sebagai penghasil probiotik yang dapat dijadikan sumber probiotik alternatif probiotik yang terdapat dalam susu fermentasi. Hasil eksperimental dianalisa secara statistik menggunakan program SPSS 12,0 dengan uji ANOVA satu arah, kemudian dilanjutkan dengan uji BNJ (beda nyata jujur) untuk mengetahui ada atau tidak perbedaan yang nyata antara kelompok perlakuan terhadap aktivitas MSA.

II. METODOLOGI

2.1 Isolasi Probiotik *Lactobacillus* sp dari Buah Manggis

Buah manggis dipisahkan dari kulitnya, ditimbang 25 gram kemudian di tambahkan 225 ml air suling steril, lalu dihomogenkan dan diatur pH hingga 3-4 dengan penambahan HCl 2N. Suspensi tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Sebanyak 0,1 ml bagian supernatan ditanam ke dalam media GYP (*Glukose Yeast Peptone*) agar yang telah ditambahkan CaCO_3 , lalu dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, sampai terlihat pertumbuhan yang ditandai adanya zona bening yang mengelilingi koloni (Ashari, 1995). Selanjutnya dimurnikan pada media yang sama.

2.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis

Kulit buah manggis dipisahkan dari bagian lain dan kotoran-kotoran yang melekat, kemudian dipotong kecil-kecil lalu dijemur di udara terbuka sampai kering dan dihaluskan dengan menggunakan mesh no. 20. Simplisia dicampur dengan etanol 96% dan dihomogenkan lalu diampkan selama 24 jam.

Pembuatan ekstrak etanol kulit manggis 1% dilakukan dengan menimbang ekstrak kulit buah manggis sebesar 0,1 gram dilarutkan dalam 10 ml etanol. Ekstrak etanol kulit manggis diinokulasikan ke dalam media heterotrof kemudian diinkubasi selama 24-48 jam. Dilihat ada pertumbuhan bakteri atau tidak.

2.3 Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri *Lactobacillus* dengan Serangkaian Uji Morfologi dan Fisiologis yang Berpotensi sebagai Probiotik

1) Uji motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan menusukkan isolat bakteri pada agar tegak

semi solid kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Kemudian diamati uji motilitas bakteri. Uji motilitas positif jika pertumbuhan koloni menyebar luas pada agar (Napitupulu et al, 2003)

2) Uji katalase

Sebanyak satu tetes H_2O_2 3% diletakkan di atas kaca obyek yang bersih. Selanjutnya diambil 1 ose bakteri *Lactobacillus* dan diletakkan pada cairan H_2O_2 3%. Adanya pembentukan gelembung menandakan katalase positif (Lay, 1994).

3) Uji ketahanan pH rendah

Sebanyak 100µl kultur bakteri murni yang telah diinkubasi pada medium GYP broth dengan suhu 37°C selama 24 jam ditambahkan 900 µl GYP broth yang diatur pH 2 menggunakan HCL 2N. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Ketahanan bakteri diamati dengan kekeruhan yang terjadi pada media. Selanjutnya digoreskan pada media GYP agar lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri yang tumbuh diidentifikasi kembali (Hardiningsih et al. 2006)

4) Uji ketahanan terhadap garam empedu

Sebanyak 100 µl kultur bakteri yang telah diinkubasi pada medium GYP broth dengan suhu 37°C selama 24 jam diinokulasikan ke dalam 900 µl GYP broth yang mengandung 1 % ekstrak garam empedu (Na taurukolat). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, selama 24 jam. Ketahanan bakteri diamati dengan kekeruhan yang terjadi pada media. Selanjutnya digoreskan pada media GYP agar dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Napitupulu et al. 2003)

2.4 Pembuatan Sediaan Uji *Saccharomyces cerevisiae*

Biakan murni *S.cerevisiae* diinokulasikan ke dalam media yeast manitol cair dan diinkubasi selama 24-48 jam pada

suhu 37°C. Pindahkan *starter S. cerevisiae* sebanyak 10% ke dalam 3 ml media yeast mannitol. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan dicuci sebanyak 2 kali dengan PBS steril dan disentrifugasi kembali. Endapan yang terbentuk ditimbang dan dibuat konsentrasi 1%. Kemudian diambil 100 µl *S. cerevisiae* diencerkan dalam 900 µl PBS dalam eppendorf.

2.5 Pembuatan Sediaan Uji Isolat *Lactobacillus* sp

Biakan murni isolat *Lactobacillus* sp diinokulasikan ke dalam media GYP cair. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya dimasukan dalam eppendorf 1,5 ml, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan dicuci sebanyak 2 kali dengan PBS steril, disentrifugasi lagi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Kemudian dilakukan penyetaraan kerapatan optiknya (OD) sebesar 0,8 menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Dihitung jumlah koloninya (CFU/ml). Selanjutnya dilakukan pengenceran 10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5. (Yulinery et al., 2006)

2.6 Uji Kemampuan Bakteri Probiotik *Lactobacillus* dengan berbagai Pengenceran dalam Menggumpalkan Sel Uji *Saccharomyces cerevisiae*

Probiotik *Lactobacillus* sp terseleksi diuji aglutinasi dengan sel model *Saccharomyces cerevisiae*. Penelitian aglutinasi dilakukan dalam berbagai pengenceran *Lactobacillus* sp. Sel model yang digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae* JB105 yang merupakan koleksi Laboratorium Genetika Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, LIPI Cibinong.

Aktivitas MSA ditunjukkan dengan terjadinya proses penggumpalan, kemudian

dihitung penggumpalan *Saccharomyces cerevisiae* yang terbentuk dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x40, selanjutnya di evaluasi dengan penambahan *D-mannosa*.

a) 50 µl suspensi bakteri dalam PBS + 50 µl PBS steril + 100 µl suspensi *Saccharomyces cerevisiae* dalam PBS 1% masukkan dalam *Microtiter plates*, homogenkan selama 10 menit, 70 Rpm. Ambil 50 µl letakkan di objek glass, amati penggumpalan yang terjadi di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x40.

b) 50 µl suspensi bakteri dalam PBS + 50 µl D-mannosa dalam PBS steril + 100 µl suspensi *Saccharomyces cerevisiae* dalam PBS 1% masukkan dalam *Microtiter plates*, homogenkan selama 10 menit, 70 Rpm. Ambil 50 µl letakkan di objek glass, amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x40.

c) 50 µl *Saccharomyces cerevisiae* dalam PBS 1% letakkan dalam objek glass, amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x40.

2.7 Uji Aglutinasi *Saccharomyces cerevisiae*

Pada pengujian ini, sel *Saccharomyces cerevisiae* yang dinding selnya mengandung mannan direaksikan dengan sampel uji, dengan konsentrasi yang bervariasi. Galur bakteri dibiakan selama semalam pada media yang sesuai, dicuci dan disuspensikan dalam 0,1 ml PBS (pH 7,4). Jumlah sel dihitung dengan menanam suspensi bakteri pada cawan petri dengan media agar yang sesuai (CFU/ml), hingga 48 jam pada suhu 37°C. Sejumlah 50 µl diencerkan empat kali dari suspensi bakteri dalam PBS yang dipersiapkan dalam cawan mikrotitrir. 50 µl PBS (pH 7,4) atau PBS dengan *D-mannosa* (konsentrasi akhir: 25 mM, yang ditambahkan sebanyak 100 µl dan 1% (w/v) suspensi *Saccharomyces cerevisiae* dalam PBS yang telah ditanam dalam media ekstrak garam. Cawan dikocok dahulu selama 10 menit pada suhu ruang dan 50 µl diambil untuk diuji aglutinasinya dengan

mikroskop cahaya terang dengan 1000 kali perbesaran (Pretzer et al, 2005)

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Isolasi dan Identifikasi *Lactobacillus* sp.

Berdasarkan hasil isolasi dan pengamatan pada media selektif (GYP+CaCO₃) menunjukkan adanya bakteri *Lactobacillus* sp dari buah manggis (*Garcinia mangostana* L). Hal ini ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan koloni dengan zona bening yang mengelilinginya. *Lactobacillus* memerlukan nutrisi kalsium, sehingga mereduksi CaCO₃ pada media. Koloni bakteri ini berbentuk cembung berwarna krem. Pada Tabel 1. dapat dilihat hasil karakterisasi

dan identifikasi bakteri *Lactobacillus* sp. Pengamatan mikroskopis menunjukkan bakteri *Lactobacillus* sp merupakan gram positif, non motil, berbentuk batang pendek sampai batang panjang dan tidak berspora. Pada uji fisiologis menunjukkan reaksi katalase negatif. Ciri-ciri tersebut sesuai dengan Holtj (1994)

3.2 Seleksi dan Karakterisasi *Lactobacillus* sp Sebagai Probiotik

Karakteristik *Lactobacillus* sp yang berpotensi sebagai probiotik dilihat berdasarkan ketahanan terhadap asam dan garam empedu. Hasil pengamatan morfologi dan fisiologis menunjukkan bahwa dari 20 isolat *Lactobacillus* sp yang diuji tidak semua memiliki karakteristik sebagai bakteri

Tabel 1. Hasil karakterisasi dan identifikasi morfologi dan fisiologi bakteri *Lactobacillus* sp.

No.	Kode isolat <i>Lactobacillus</i> sp.	Asal Sampel	Uji Kata lase	Bakteri Gram	Bentuk	Uji Motilitas	Spora
1	TM1	Tasikmalaya	-	+	Batang pendek	Non motil	-
2.	TM2	Tasikmalaya	-	+	Batang pendek	Non motil	-
3.	BST1	Berastagi, Medan	-	+	Batang panjang	Non motil	-
4.	BST2	Berastagi, Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-
5.	BST3	Berastagi, Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-
6.	BST4	Berastagi, Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-
7.	BST5	Berastagi, Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-
8.	BST6	Berastagi, Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-
9.	BST7	Berastagi, Medan	-	+	Batang panjang	Non motil	-
10	BST8	Berastagi, Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-
11	BST9	Berastagi, Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-
12	P.SMB1	Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-
13	P.SMB2	Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-
14	P.SMB3	Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-
15	P.SMB4	Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-
16	P.SMB5	Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-
17	P.SMB6	Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-
18	P.SMB7	Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-
19	P.SMB8	Medan	-	+	Batang panjang	Non motil	-
20	P.SMB9	Medan	-	+	Batang pendek	Non motil	-

Keterangan : + Menunjukkan hasil positif pada pengamatan
 - Menunjukkan hasil negatif pada pengamatan

probiotik. Dari 20 isolat yang diuji terdapat 11 isolat yang menunjukkan potensi sebagai probiotik (Tabel 2).

Isolat *Lactobacillus* sp yang berpotensi sebagai probiotik dapat bertahan hidup di pH 2, hal ini berarti bahwa sebagian besar isolat dapat melewati saluran lambung yang bersifat asam dimana pH asam lambung sangat rendah yakni berkisar antara 2-3 (Groff dan Gropper, 2001). Hal ini sesuai dengan beberapa hasil penelitian yang menunjukkan bahwa BAL, terutama *Lactobacillus*, termasuk bakteri paling tahan terhadap asam dan merupakan flora normal saluran pencernaan (Fuller 1999). Menurut penelitian Apriliana (2007), dari 24 isolat, terdapat 17 isolat yang hidup pada pH 2.

Pada penelitian ini, 11 isolat yang

tahan terhadap pH 2 dapat mempertahankan pertumbuhan pada media GYPcair+HCl maupun media agar. Penambahan HCl dalam media cair untuk mendekati kondisi lambung yang juga mengandung HCl. Sebelas isolat *Lactobacillus* sp tersebut memiliki ketahanan yang lebih besar terhadap kerusakan membran akibat terjadinya penurunan pH ekstraseluler dibandingkan dengan *Lactobacillus* sp. lainnya

Untuk dapat bertahan dan tumbuh pada saluran pencernaan, bakteri asam laktat sebagai probiotik juga harus mampu melewati bagian atas saluran usus dimana empedu disekresikan ke dalam usus. Cairan empedu merupakan campuran dari asam empedu, kolesterol, asam lemak, fosfolipid, dan pigmen empedu. Sekresi pankreas

Tabel 2. Hasil uji ketahanan terhadap asam, garam empedu dengan penambahan Na.taurokolat 1 % bakteri *Lactobacillus* sp

No	Kode isolat	Uji Ketahanan asam				Uji Na Taurokolat 1%
		Kontrol	pH 4	pH 3	pH 2	
1.	TM1	+	+	+	+	+
2.	TM2	+	+	+	-	-
3.	BST1	+	+	+	+	+
4.	BST2	+	+	+	+	+
5.	BST3	+	+	+	+	+
6.	BST4	+	+	+	+	+
7.	BST5	+	+	+	+	+
8.	BST6	+	+	+	-	-
9.	BST7	+	+	+	+	+
10.	BST8	+	+	+	+	+
11.	BST9	+	+	+	-	-
12.	P.SMB	+	+	+	-	-
13.	P.SMB	+	+	+	+	+
14.	P.SMB	+	+	+	+	+
15.	P.SMB	+	+	+	-	-
16.	P.SMB	+	+	+	-	-
17.	P.SMB	+	+	+	-	-
18.	P.SMB	+	+	+	-	-
19.	P.SMB	+	+	+	+	+
20.	P.SMB	+	+	+	-	-

Keterangan: + = tumbuh, - = tidak tumbuh

juga menghasilkan enzim-enzim lipolitik. Kombinasi tersebut bersifat bakterisidal bagi mikroorganisme dalam tubuh kecuali bagi beberapa genus penghuni usus yang tahan terhadap empedu (Hill, 1995).

Pada penelitian ini dilakukan uji ketahanan *Lactobacillus* terhadap garam empedu sebesar 1%. Konsentrasi ini dipilih lebih besar dari konsentrasi garam empedu di duodenum yang setara dengan 0,5% (Zavaglia et al., 1998), karena bertujuan agar probiotik yang diajukan dapat digunakan pada orang yang mengalami produksi garam empedu yang berlebihan sehingga memiliki potensi yang menguntungkan salah satunya dalam menurunkan kolesterol. Menurut Begley et al. (2006) probiotik mempunyai kemampuan untuk menghidrolisis garam empedu. Pemberian probiotik secara oral telah menunjukkan pengurangan kadar kolesterol yang signifikan sebanyak 22-33%. Begleys et al. (2006) mengatakan bahwa beberapa *Lactobacillus* mempunyai enzim yang dapat menghidrolisa garam empedu (*bile salt hidrolase*) dengan cara mengasimilasi kolesterol oleh bakteri dan mengikat kolesterol pada dinding sel bakteri.

Hasil penelitian menunjukkan dari 11 isolat yang tahan pH rendah juga tahan terhadap Na taurokolat 1%. Hal ini ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan isolat pada GYP cair+ Na taurokolat 1% dan pada media GYP agar (Tabel 3). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Ngatirah et al. (2000) bahwa dari isolat yang diuji ketahanannya terhadap garam empedu, semuanya mampu tumbuh pada kondisi penambahan garam empedu.

Sembilan isolat *Lactobacillus* yakni TM2, BST6, BST9, P.SMB1, P.SMB4, P.SMB5, P.SMB6, P.SMB7, dan P.SMB9 tidak tahan terhadap pH rendah dan garam empedu kemungkinan mengalami kerusakan materi intraseluler yang sangat besar sehingga menyebabkan kematian. Empedu bersifat sebagai senyawa aktif permukaan sehingga dapat menembus dan bereaksi

dengan sisi membran sitoplasma yang bersifat lipolitik, menyebabkan perubahan dan kerusakan struktur membran (Apriliana, 2007). Enzim lipolitik tersebut juga mungkin bereaksi dengan asam lemak pada membran sitoplasma bakteri menyebabkan perbedaan permeabilitas dan karakteristiknya sehingga dapat mempengaruhi ketahanannya terhadap garam empedu.

Dari hasil pengujian, 11 isolat yang memperlihatkan potensi sebagai probiotik. Untuk mengetahui peran probiotik, khususnya *Lactobacillus* dalam menghambat penyakit infeksi, dilakukan uji pelekatan spesifik manosa (MSA).

3.3 Pengujian Pelekatan Spesifik Manosa (MSA)

Pada penelitian ini syarat uji MSA dilakukan dalam rentang jumlah sel/ml tiap isolat. Jumlah bakteri yang hidup dan yang akan di uji dihitung dengan menggunakan metode *plate count*. Perhitungan jumlah koloni bertujuan untuk mengetahui jumlah koloni *Lactobacillus* uji. Tabel 4. menunjukkan hasil penghitungan bakteri *Lactobacillus*. Rentang *Lactobacillus* uji yang didapat 6,8x10⁹ sampai 1,53x10¹⁰ CFU/ml (Tabel 3).

3.4 Uji Isolat Probiotik *Lactobacillus* sp Dalam Menggumpalkan Sel Model *S. cerevisiae*

Sebelum melakukan uji aglutinasi, bakteri yang ditumbuhkan pada media GYP cair dan *Saccharomyces cerevisiae* ditumbuhkan pada media Yeast manitol kemudian dicuci terlebih dahulu dengan menggunakan *Phosphate Buffered Saline* (PBS). *Phosphate Buffered Saline* bertujuan untuk membersihkan sel-sel *Lactobacillus* dan *S. cerevisiae* dari sisa-sisa senyawa yang terdapat dalam masing-masing media awal. Selanjutnya dilakukan pengenceran 10⁻¹ sampai 10⁻⁵ tiap isolat *Lactobacillus* sp dan tiap pengenceran diuji aglutinasi dengan sel model *S. cerevisiae*.

Dari ke-11 isolat *Lactobacillus* uji menunjukkan terjadinya penggumpalan

Tabel 3. Hasil *Total Plate Count* (TPC) dari *Lactobacillus* uji setelah diinkubasi pada suhu 37°C, selama 24 jam

Jenis <i>Lactobacillus</i>	Jumlah bakteri (CFU/ml)
TM 1	9,80 x 10 ¹⁰
BST 1	6,80 x 10 ⁹
BST 2	1,13 x 10 ¹⁰
BST 3	9,30 x 10 ⁹
BST 4	8,40 x 10 ⁹
BST 5	1,17 x 10 ¹⁰
BST 7	1,03 x 10 ¹⁰
BST 8	8,90 x 10 ⁹
BST 9	1,52 x 10 ¹⁰
P.SMB 2	1,07 x 10 ¹⁰
P.SMB 3	9,80 x 10 ¹⁰
P.SMB 8	1,31 x 10 ¹⁰

dan pada pengenceran 10-5 ternyata masih menunjukkan terjadi penggumpalan dan ini berbeda nyata antar perlakuan pengenceran. Perbandingan hasil aglutinasi *S. cereviceae* tanpa penambahan *D mannosa* dapat dilihat pada Gambar 1.

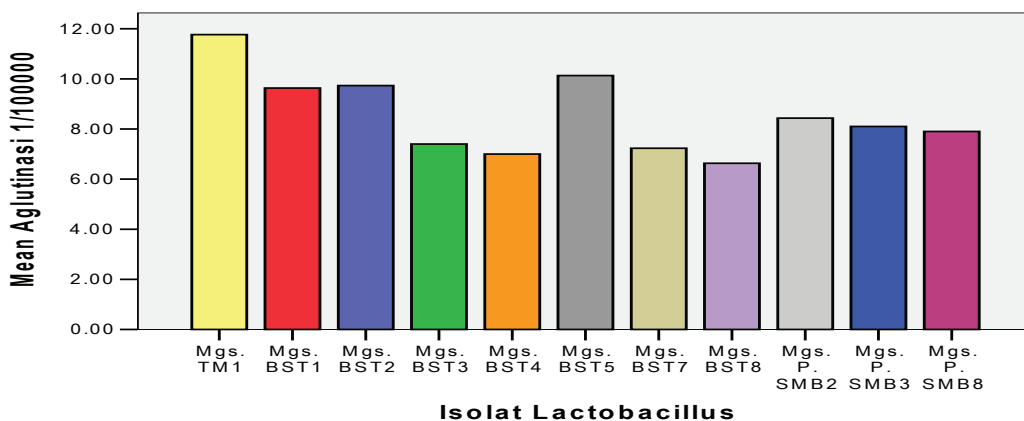
Dari hasil pengamatan aglutinasi menunjukkan bahwa isolat *Lactobacillus* buah manggis memiliki kemampuan dalam

mengaglutinasi *S. cereviceae*. Pada gambar 1. terlihat 4 isolat yang menunjukkan kemampuan yang lebih besar dibandingkan isolat yang lain yaitu *Lactobacillus* TM1, BST1, BST2 dan BST 5 memiliki jumlah penggumpalan lebih besar dari *Lactobacillus* lainnya. Dari hasil analisis *Lactobacillus* TM1 terlihat perbedaan yang signifikan dari isolat *Lactobacillus* yang lain. Pada Gambar 2, dapat dilihat perbandingan hasil aglutinasi *Saccharomyces cereviceae* dengan penambahan *D-mannosa*

Hasil penghitungan jumlah aglutinasi dari tiap tiap isolat menunjukkan penurunan jumlah aglutinasi dari tiap isolat *Lactobacillus* dalam konsentrasi pengenceran setelah penambahan *D-manosa*. Keempat isolat yakni TM1, BST1, BST 2, BST 5 yang menunjukkan penggumpalan terbesar sebelum penambahan *D-manosa* tetapi setelah penambahan *D-manosa* terjadi penurunan jumlah penggumpalan. Perbedaan yang nyata diperlihatkan oleh *Lactobacillus* TM1 artinya, *Lactobacillus* TM1 memperlihatkan aktifitas MSA lebih besar daripada *Lactobacillus* lainnya.

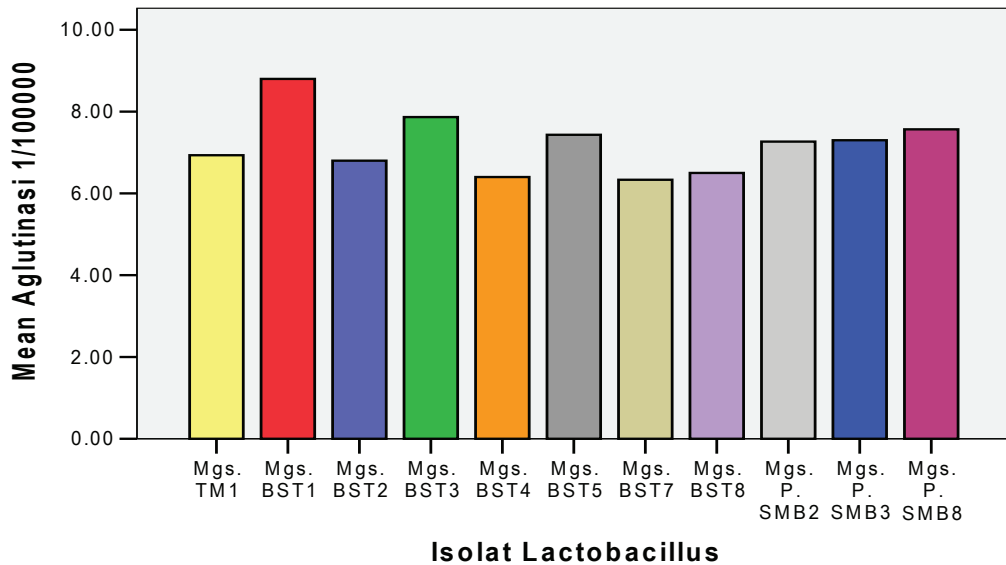
Jumlah penggumpalan *S. cerevisiae* tidak dapat dihambat semua oleh *D-mannosa*, tetapi penambahan *D-mannosa* dapat

grafik Aglutinasi *Saccharomyces cereviceae* tanpa *D-mannosa*



Gambar 1. Grafik aglutinasi *Saccharomyces cerevisiae* tanpa *D-mannosa* pada pengenceran 10-5

Grafik aglutinasi *Saccharomyces cerevicea* dengan D-Mannosa



Gambar 2. Grafik aglutinasi *Saccharomyces cerevisiae* dengan penambahan *D-mannosa* pada pengenceran 10-5

mengurangi jumlah penggumpalan sel model *Saccharomyces cerevisiae*. Pada Gambar 3 dapat dilihat hasil aglutinasi *Saccharomyces cereviceae* tanpa penambahan *D-mannosa* dan dengan penambahan *D-mannosa* antar pengenceran pada masing-masing isolat yakni isolat TM1, BST1, BST 2, BST 5 (Gambar 3, 4, 5, 6)

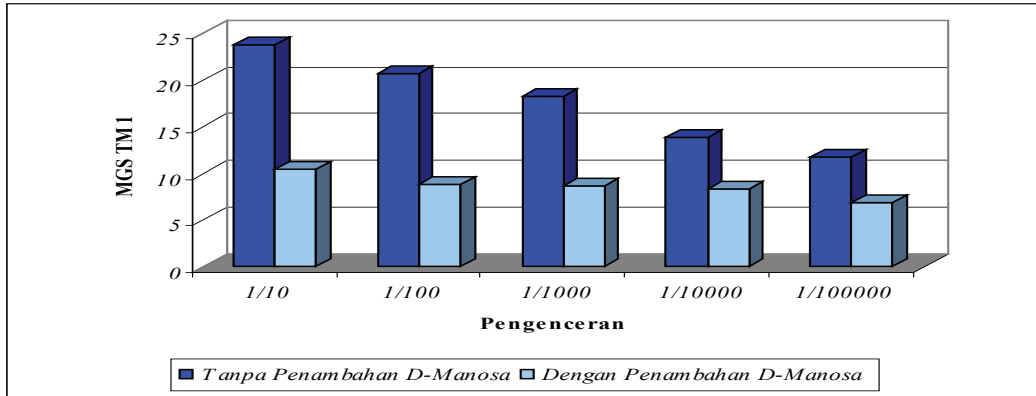
Pada Gambar 3, 4, 5, 6 dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan penggumpalan yang signifikan antara pengenceran pada masing-masing isolat *Lactobacillus*. Pengenceran 10-1 menunjukkan jumlah penggumpalan *S. cereviceae* yang lebih banyak dibandingkan dengan pengenceran 105. Terlihat juga pengurangan jumlah penggumpalan sel model antar isolat pada berbagai pengenceran setelah penambahan *D-mannosa*. Hal ini menunjukkan adanya penghambatan oleh *D-mannosa*. Pengurangan jumlah penggumpalan *S. cereviceae* setelah penambahan *D-mannosa* menunjukkan adanya aktivitas MSA (*Mannose Specific*

Adhesin). Aktivitas ini bertanggungjawab untuk kompetisi perlekatan probiotik pada dinding epitel usus. Aktivitas ini juga dapat berperan dalam immobilisasi patogen dan peningkatan respon imunitas untuk menghancurkan patogen tersebut.

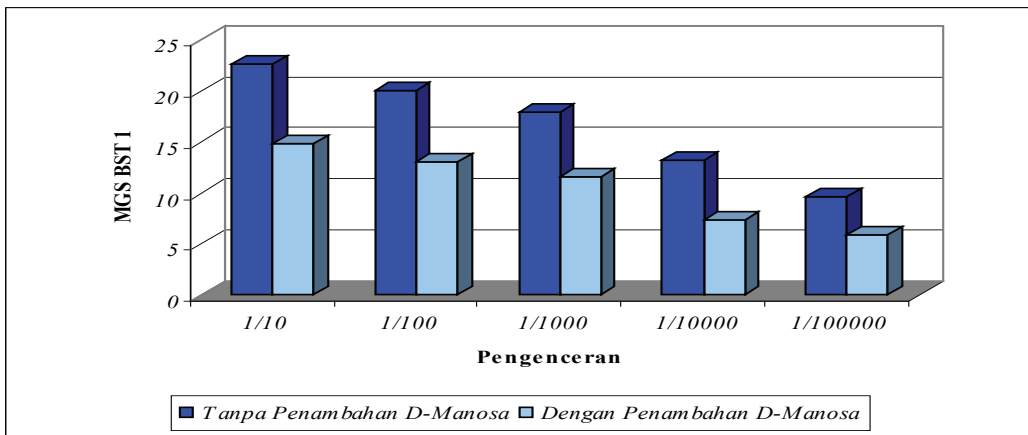
Dari grafik data pengamatan dapat disimpulkan bahwa isolat *Lactobacillus*, TM1, BST1, *Lactobacillus* BST2, BST5, BST7 dan P.SMB2 memiliki aktivitas MSA. Hal ini dapat dilihat dari adanya penurunan pada jumlah sel yang digumpalkan oleh isolat ini setelah penambahan *D-Mannosa*. Sedangkan pada isolat yang lain, aktivitas penggumpalan yang terjadi merupakan fenomena yang lain selain aktivitas MSA. Hal ini dapat dilihat dari tidak terjadi penurunan jumlah sel yang digumpalkan setelah penambahan *D-mannosa*.

3.5 Uji Ekstrak Etanol 96% Kulit Manggis salam Menggumpalkan Sel Mode *Saccharomyces cerevisiae*

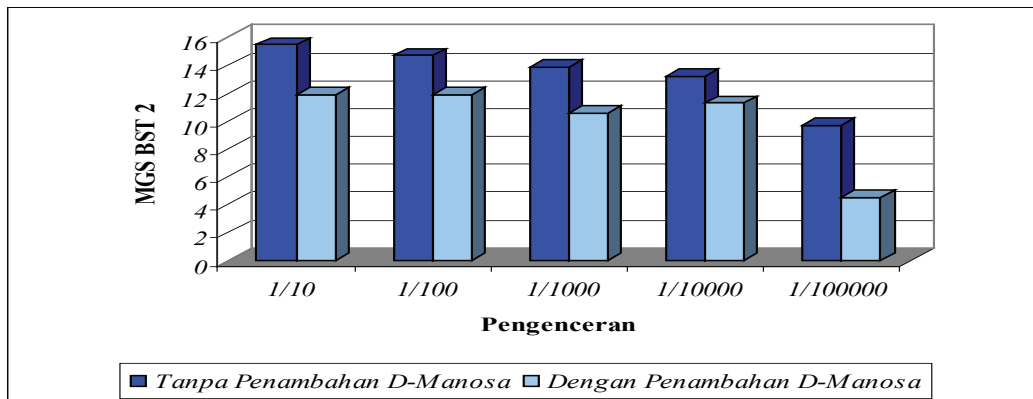
Pada Tabel 5. dapat dilihat hasil pengamatan penggumpalan *Saccharomyces*



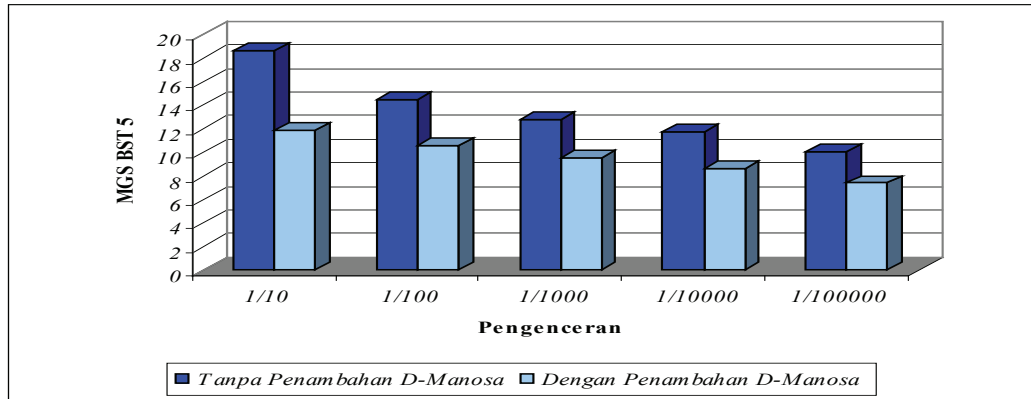
Gambar 3. Grafik aglutinasi *S.cerevisiae* tanpa penambahan *D-manosa* dan dengan penambahan *D-manosa* antar pengenceran terhadap *Lactobacillus* TM1



Gambar 4. Grafik aglutinasi *S.cerevisiae* tanpa penambahan *D-manosa* dan dengan penambahan *D-manosa* antar pengenceran terhadap *Lactobacillus* BST1



Gambar 5. Grafik aglutinasi *S.cerevisiae* tanpa penambahan *D-manosa* dan dengan penambahan *D-manosa* antar pengenceran terhadap *Lactobacillus* BST2



Gambar 6. Grafik aglutinasi *S. cerevisiae* tanpa penambahan *D-manosa* dan dengan penambahan *D-manosa* antar pengenceran terhadap *Lactobacillus* BST5

cerevisiae oleh ekstrak etanol kulit buah manggis.

Berdasarkan hasil pengamatan ekstrak etanol kulit dalam metode ini, tidak terdeteksi mempunyai pelekatan spesifik manosa. Hal ini dilihat dari tidak adanya perbedaan jumlah penggumpalan sel model *Saccharomyces cerevisiae* sebelum maupun setelah penambahan *D-manosa*. Artinya, tidak terlihat jelas pengaruh penambahan *D-manosa*, mungkin karena manosa tidak terekstrak oleh pelarut etanol. Tetapi ekstrak etanol kulit manggis mempunyai aktivitas penghambatan terhadap sel model, karena memperlihatkan penggumpalan dan merubah ukuran sel model dari ukuran normal menjadi kecil

disimpulkan bahwa terdapat bakteri *Lactobacillus* sp dalam buah manggis. Bakteri tersebut berpotensi sebagai probiotik, karena tahan terhadap pH rendah dan toksisitas garam empedu. Beberapa diantara bakteri tersebut menunjukkan aktivitas *Mannose-Specific Adhesin* (MSA), hal ini berarti bahwa aktivitas MSA adalah strain spesifik. Aktivitas MSA selain dipengaruhi strain spesifik juga dipengaruhi secara signifikan oleh konsentrasi sel probiotik. Dari 20 isolat *Lactobacillus* sp didapat hanya 11 isolat yang berpotensi sebagai probiotik. Empat isolat *Lactobacillus* yaitu TM1, BST1, BST2, dan BST5 menunjukkan aktivitas MSA secara signifikan atau lebih tinggi daripada yang lainnya. Selain itu, tidak terdapat aktivitas MSA dalam ekstrak etanol kulit buah manggis.

IV. KESIMPULAN & SARAN

4.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat

4.2 Saran

Penelitian ini adalah penelitian pendahuluan secara in vitro, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada

Konsentrasi ekstrak uji 1%	Jumlah rata-rata penggumpalan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			X	Etanol+ sel <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
Tanpa <i>D-manosa</i>	26,7	24,1	24,6	25,1	Ukuran Sel <i>S.cerevisiae</i> normal
Dengan <i>D-manosa</i>	26,1	24,5	25,0	25,2	Ukuran Sel <i>S.cerevisiae</i> normal

Tabel 5. Hasil pengamatan ekstrak etanol kulit buah manggis dalam menggumpalkan sel model *S. cerevisiae*

mahluk hidup secara in vitro dari probiotik *Lactobacillus* asal buah manggis. Empat Isolat *Lactobacillus* yaitu TM1, BST1, BST2, dan BST5 dapat direkomendasikan lebih lanjut untuk pengembangan manfaat dalam bidang kesehatan maupun produk farmasi, misalnya makanan kesehatan seperti pembuatan sediaan probiotik immunomodulator untuk penanggulangan penyakit infeksi. Selain itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai gen fungsional *Mannose-Specific adhesin* (MSA).

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, M.R, M. O. Moss., 2000. *Food Microbiology. Second Edition*. Athenaeum Press Ltd. Gateshead, Tyne and Wear. UK;
- Adlerberth, I. S. Ahrne, M., Johansson, G. Molin, L. A., hanson, A. Wold., 1996. *A mannose-Specific Adherence Mechanism in Lactobacillus plantarum Conferring Binding to the Human Colonic Cell Line HT-29*. Journal of Applied And Environmental Microbiology. Vol.62(7):2244-51.
- Apriliana., 2007. *Seleksi Bakteri Asam Laktat yang Berpotensi sebagai Probiotik dari Isolat Air Susu Ibu*. Skripsi. Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan dan Gizi. IPB, Bogor
- Ashari, S., 1995. *Holtikultura Aspek Budidaya*, Penerbit UI. Jakarta. hal. 340-5.
- Baratawidjaja, G., 2004. *Imunologi Dasar*. Edisi IV. Jakarta: Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. hal. 11-5.
- Begley M., C.Hill, C.G.M.Gahan., 2006. *Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics*. Journal of microbiology, Vol.72(3):1729-1738.
- Boekhorst, J., M. Wels, M. Kleerebezem, dan R.J. Siezan., 2006. *The Predicted Secretome of Lactobacillus plantarum WCFI Sheds light on Interactions With Its Environment*. Microbiology SGM Journal. p. 152, 3175-83
- Brooks,G.F., J.S.Butel, S.A. Morse., 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 23. Diterjemahkan oleh Hartanto H, Rachman C, Dimanti A, Diani A. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran. hal. 149-25
- Donaldson, M., 2004. *Probiotics*. The article of Hallelujah Acres Foundation.
- Fardiaz S., 1992. *Bahan Kuliah Mikrobiologi Pangan*. Bogor: IPB. hal 140-51.
- Fuller, R., 1999. *Probiotics in Man and Animals*. J. Appl. Bacteriology 66,378-365. In: Tannock, G.W. (eds). *Probiotic: A critical review*. Harizon Scientific Press, Norfolk, England.
- Ganong W.F., 2004. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 20. Diterjemahkan oleh Widjajakusumah D, Irawati D, Siagian M, Moeloek D, Pendit U. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran. hal 487.
- Groff, J.L. dan Gropper, S.S., 2001. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. Wadsworth Canada.
- Hardiningsih, R., R.N.Napitupulu, T.Yulinery., 2006. *Isolasi dan Uji Resistensi beberapa Isolat Lactobacillus pada pH Rendah*. Biodiversitas. Vol.7(1):15-17
- Heyne K., 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia, jilid III*, Terjemahan Badan Litbang Kehutanan, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta. hal. 1385-6.
- Hidayat,N., C. Masdiana, S.Suhartini., 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Andi Offset. hal 27-28,152-54,175.
- Hill, M.J., 1995. *Role of Gut Bacteria in Human Toxicology and Pharmacology*, Taylor, New York.
- Holtj. G., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T. & Williams, ST., 1994. *Bergeys Manual Determinative Bacteriology*. Baltimore: William and Wilkins Baltimore.526-566.
- Johanna W., 2000. *Pemeriksaan Pendahuluan Efek Kulit Buah Manggis (Mangostanae Pericarpium) sebagai Obat Diare*.Skripsi. Jakarta. Fakultas

- Farmasi Universitas Pancasila. hal 21.
- Lay, B.W., 1994. *Analisis Mikrobiologi di Laboratorium*. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta
- Napitupulu, R. N. R., T. Yulinery, R. Hardiningsih, E. Kasim, N.Nurhidayat., 2003. *Daya Ikat Kolesterol dan Asam Organik Isolat Lactobacillus Terseleksi untuk Penurun Kolesterol*. Prosiding PIT PERMI Bidang Kesehatan, Industri dan Lingkungan, Bandung 29-30 Agustus 2003. P.316-320.
- Ngatirah, E., E.S.Harmayani, Rahayu, dan Utami, T., 2000. *Seleksi Bakteri Asam Laktat Sebagai Agensia Probiotik yang Berpotensi Menurunkan Kolesterol*. Di dalam: Prosidium Seminar Nasional. Hal 63-78.
- Pretzer, G., J.Snel, D.Molenaar, A.Wiersma, J.Lambert, R. Van der Meer., 2005. *Biodiversity-Based Identification and Functional Characterization of The Mannose-Spesifik Adhesin*. Journal of Bacteriology vol.187:6128-36.
- Rolfe, D.R., 2000. *The Role of Probiotic Cultures in The Control of Gastrointestinal Health*. Journal of nutrition. hal 400-396.
- Verheij, E.W.M and R.E.Cornel., 1997. *Prosea Sumber Daya Nabati Asia Tenggara 2. Buah-Buahan Yang Dapat Dimakan*. Jakarta: PT Gramedia Pusaka Utama; hal. 220.
- Vrese de M, Marteau R P., 2007. *Probiotics and Prebiotics: Effect on Diarrhea*. The journal of nutrition.p.804-803.
- Yulinery, T., E.yulianto, N.Nurhidayat., 2006. *Uji Fisiologis Probiotik Lactobacillus sp. Mar 8 yang Telah Dienkapsulasi dengan Menggunakan Spray Dryer untuk Menurunkan Kolesterol* b i o d i v e r s i t a s Vol. 7(2):118-122
- Zavaglia, A. G., Kociubinski, Perez, P., Antoni, G.D., 1998. *Isolation and Characterization of Bifidobacterium Strain for Probiotics Formulation*. J. Food Protect. Vol.61(7):865-873.
- Zimmermann F.K, K.D.Entian., 1996. *editors. Yeast Sugar Metabolism*. Jerman: Technomic Publishing. p13.

