

AKTIVITAS ANTIMIKROBIAL BAKTERI ASAM LAKTAT ISOLAT SUSU KAMBING TERHADAP BAKTERI PATOGEN SALURAN PENCERNAAN

N.W. Nursini, I.B.A. Yogeswara

Fakultas Ilmu Kesehatan, Sains dan Teknologi, Universitas Dhyana Pura, Bali

Email: nursini_2811@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimikrobal bakteri asam laktat isolat susu kambing terhadap bakteri patogen saluran pencernaan, sehingga diperoleh informasi apakah isolat tersebut dapat dikembangkan menjadi probiotik isolat lokal. Uji ini dilakukan dengan metode sumur (*well diffusion agar method*). Sebanyak 100 isolat uji ditumbuhkan pada medium MRS broth selama 48 jam pada suhu 37°C. Indikasi pertumbuhannya dilihat dengan kekeruhan yang terlihat pada tabung, kemudian disiapkan supernatan bebas sel (SBS) asam dan SBS netral. Bakteri patogen saluran pencernaan, seperti *E.coli*, *Stap.aureus* dan *Sal.typhi* ditumbuhkan pada media NB selama 24 jam. Berdasarkan penelitian didapatkan hanya 9 isolat mampu menghambat bakteri *Sal.typhi* dan 5 isolat (GM35, GM46, GM47, GM49, GM102) mampu menghambat pertumbuhan ketiga bakteri patogen saluran cerna dengan zona hambat berkisar antara 7,00 mm sampai 9,33 mm. Ketika supernatan tersebut dinetralkan (SBS netral), tidak ada patogen uji yang terhambat pertumbuhannya. Jika dibandingkan dengan zona hambatan yang dihasilkan oleh *chloramphenicol* pada patogen uji (*E.coli*, *Stap. aureus* dan *Sal. typhi*), efektivitas penghambatan relatif isolat BAL yang diuji pada penelitian ini berada pada kisaran 16,66-34,68%.

Keywords : bakteri asam laktat, patogen saluran cerna, probiotik isolat lokal

Pendahuluan

Pergeseran pola makan masyarakat modern dengan konsumsi bahan makanan yang mengandung protein dan lemak yang tinggi serta kandungan serat yang rendah diduga sebagai salah satu pemicu munculnya berbagai penyakit yang berhubungan dengan saluran pencernaan (Saarela *et al.*, 2002). Modifikasi komposisi saluran pencernaan dapat dilakukan melalui konsumsi bakteri hidup, sehingga dapat menjaga keseimbangan bakteri yang menguntungkan di dalam saluran pencernaan yang disebut probiotik (Prangdimurti, 2001; FAO/WHO, 2002; Drisko *et al.*, 2003; Lisal, 2005; Begley dan Gahan, 2006; Kiani, 2006). Mikroflora yang digolongkan sebagai probiotik adalah Bakteri Asam Laktat (BAL) yang dapat memproduksi asam laktat terutama dari golongan *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria*. Beberapa penelitian menyatakan bahwa BAL mampu menekan jumlah bakteri patogen penyebab gangguan pencernaan, mampu membentuk koloni, sehingga menjaga keseimbangan bakteri yang menguntungkan dalam usus dan meningkatkan kekebalan tubuh (Prangdimurti, 2001).

Belakangan ini, probiotik berkembang semakin pesat sejalan dengan makin banyaknya penyakit yang berhubungan dengan terganggunya komposisi bakteri saluran pencernaan, sehingga probiotik menjadi salah satu pilihan terapi. Probiotik telah banyak dimanfaatkan dalam penanggulangan berbagai penyakit infeksi di negara-negara maju, seperti menanggulangi diare

pada anak-anak (Marteau *et al.*, 2001), atopi (Kalliomaki *et al.*, 2003), kelainan sistem imun (Isolauri *et al.*, 2002), infeksi *Helicobacter pylori*, vaginosis (Reid *et al.*, 2001) dan kanker kolon (Hirayama dan Rafter, 1999). Mengonsumsi berbagai produk makanan fungsional seperti probiotik merupakan salah satu upaya administrasi mikroorganisme probiotik ke dalam tubuh (Stanton, *et al.*, 2001).

Bakteri asam laktat terutama dari kelompok *Bifidobacteria* dan beberapa spesies *Lactobasili*, *Streptococcus* dan *Pediococcus* telah diketahui mempunyai peranan penting dalam menjaga fungsi fisiologis dan kesehatan manusia dengan cara meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Pato, 2003). Selain itu, kelompok bakteri ini juga diketahui mampu menekan jumlah bakteri patogen, seperti *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* yang dapat menyebabkan penyakit gangguan saluran pencernaan. Hal ini disebabkan oleh kemampuan BAL untuk menghasilkan senyawa aktif, seperti asam laktat sebagai produk metabolit primer, bakteriosin sebagai produk metabolit sekunder, serta komponen antimikrobal lainnya seperti diasetil dan hidrogen peroksida (Kusmiati dan Malik, 2002). Beberapa penelitian lain juga melaporkan bahwa BAL mampu membentuk koloni sehingga dapat menjaga keseimbangan bakteri menguntungkan di dalam usus, mengurangi racun di dalam usus, dan meningkatkan kekebalan tubuh (Fuller, 1989; Prangdimurti, 2001). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas antimikrobal dari BAL isolat susu kambing dalam rangka pengembangan probiotik isolat lokal.

Metode Penelitian

Bahan dan alat

Media yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah NaCl 0,85% (Merck), MRS broth (Oxoid), MRS agar (Oxoid), Nutrient Agar (Oxoid), Lactosa broth (Oxoid), Nutrient broth (Oxoid), Manitol Salt broth (Oxoid), gram stain (Bio Analitika), minyak emersi (Merck), H₂O₂ (Hidrogen peroxide) (Merck).

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi (Pyrex), cawan petri (Pyrex), gelas ukur 100 ml (Pyrex), Erlenmeyer 500ml (Pyrex), gelas beaker 500ml (Pyrex), jarum ose, batang gelas bengkok, Anaerob chamber (Misubishi), pH meter (Jenway), Laminar Air Flow (ESCO), Inkubator (Mermert), slide (Froested), cover glass (Froested), mikroskop foto (Olympus-BX51), Spektrofotometer (Genesys 20), sentrifigasi (Hitachi).

Penyegaran Materi Hidup

Stok isolat BAL susu kambing yang disimpan dalam gliserol 30% pada suhu -20°C yang merupakan koleksi UNUDCC diambil sebanyak satu loop ose dan diinokulasikan kedalam tabung reaksi yang berisi 5ml media MRS broth. Tabung reaksi diinkubasi secara aerob selama 48 jam pada suhu 37°C . Stok bakteri uji ditumbuhkan dengan cara menginokulasikan satu ose biakan murni bakteri patogen *E. coli*, *S. thypi* dan *S. aureus* ke dalam 5 mL medium NB (Nutrient Broth) dan diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam untuk mendapatkan suspensi bakteri patogen dengan kerapatan yang setara dengan 10^8 sel/mL. Hasil positif ditunjukkan oleh timbulnya kekeruhan pada tabung. (Portugal *et al.*, 2006).

Uji Konfirmasi

Pewarnaan Gram

Bakteri asam laktat isolat susu kambing diapuskan pada gelas objek kemudian difiksasi di atas bunsen (kira – kira 20 cm di atas bunsen) dan diwarnai dengan gentian violet. Setelah 1 menit, dicuci dengan air mengalir, kemudian ditetesi dengan larutan lugol, dan didiamkan selama 1 menit, lalu dicuci kembali dengan air mengalir. Selanjutnya apusan tersebut dicuci dengan alkohol 96% selama 5 detik, dicuci dengan air dan diwarnai dengan pewarna safranin, didiamkan 1 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir. Sel bakteri yang telah diwarnai, dikeringkan dengan cara difiksasi di atas bunsen. Kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan menggunakan minyak emersi (perbesaran 100 kali) (Lay, 1994).

Uji Katalase

Bakteri asam laktat isolat susu kambing yang diperoleh dibuat hapusan pada gelas objek kemudian ditetesi 2 tetes H_2O_2 10%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas oksigen yang dihasilkan dari degradasi H_2O_2 oleh enzim katalase (Sujaya *et al.*, 2008).

Produksi Gas dari Hasil Metabolisme Glukosa

Produksi gas dilakukan dengan memasukkan jarum ose panas (*hoot-loop*) ke dalam biakan BAL isolat susu kambing yang ditumbuhkan dalam media MRS broth. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gas karbondioksida hasil metabolisme glukosa (Sperber dan Swan, 1976).

Uji Daya Hambat BAL terhadap Bakteri Patogen Saluran Pencernaan

Isolat yang berhasil diisolasi diuji kemampuannya secara *in vitro* dalam menghambat beberapa bakteri patogen (*E. coli*, *S. thypi* dan *S. aureus*) penginfeksi saluran pencernaan dengan menggunakan metode sumur (*well diffusion agar method*) yang dikembangkan oleh Schillinger dan Luke (1989). Uji diawali dengan penyegaran isolat BAL dan bakteri patogen

saluran pencernaan. Tabung yang berisi suspensi isolat BAL disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 5 menit, sehingga diperoleh supernatan bebas sel. Supernatan bebas sel (SBS) hasil sentrifugasi ditampung masing-masing sebanyak 1 ml dalam 2 *ependorf*. Supernatan bebas sel dalam *ependorf* pertama disebut SBS asam dan SBS dalam *ependorf* ke-2 dinetralkan (pH 7). Selanjutnya sebanyak 100 µL suspensi biakan bakteri patogen disebar dengan di atas medium NA yang telah dipersiapkan sebelumnya dan dibiarkan kering selama kurang lebih 30 menit. Setelah kering, pada medium dibuat sumur-sumur dengan diameter antara 3 sampai 4 mm (Sujaya *et al.*, 2008).

Kemudian SBS asam dan SBS netral yang telah dipersiapkan sebelumnya masing-masing didepositkan sebanyak 20 µL pada sumur-sumur yang telah disiapkan diatas, dibiarkan selama 20-30 menit sampai semua terdifusi secara merata kesemua arah disekitar sumur, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, dan diamati terbentuknya zona hambatan pertumbuhan bakteri patogen disekitar sumur. Media yang tanpa diinokulasi dengan BAL dipakai sebagai kontrol. Adanya aktivitas antagonisme dari SBS asam dan SBS netral dari isolat BAL ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening disekitar sumur (Ramona, 2003; Sujaya *et al.*, 2008).

Hasil dan Pembahasan

Penyegaran Materi Hidup

Bakteri Asam Laktat yang telah diisolasi pada penelitian sebelumnya, saat ini kembali di *refresh* untuk dapat di lakukan uji-uji selanjutnya diantaranya adalah uji konfirmasi untuk memastikan bahwa kondisi isolat tidak berubah. Berdasarkan hasil konfirmasi pada Tabel 1. dapat dilihat bahwa tidak ada isolat yang berubah. Semua isolat merupakan kelompok bakteri Gram positif, negatif pada uji katalase, tidak membentuk gas dalam proses metabolismenya (*homofermentative bacteria*), dan seluruhnya berbentuk bulat.

Ketahanan BAL terhadap Bakteri Patogen Saluran Cerna

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat dijelaskan bahwa dari 62 isolat yang di uji terhadap bakteri patogen saluran cerna (*E.coli*, *Stap. aureus* dan *Sal. typhi*) untuk supernatan asam hanya 5 isolat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, 9 isolat hanya mampu menghambat bakteri *Sal.typhi* dan 5 isolat (GM35, GM46, GM47, GM49, GM102) mampu menghambat pertumbuhan ketiga bakteri patogen saluran cerna dengan zona hambat berkisar antara 7,00mm sampai 9,33mm. Ketika supernatan tersebut dinetralkan (SBS netral), tidak ada patogen uji yang terhambat pertumbuhannya. Jika dibandingkan dengan zona

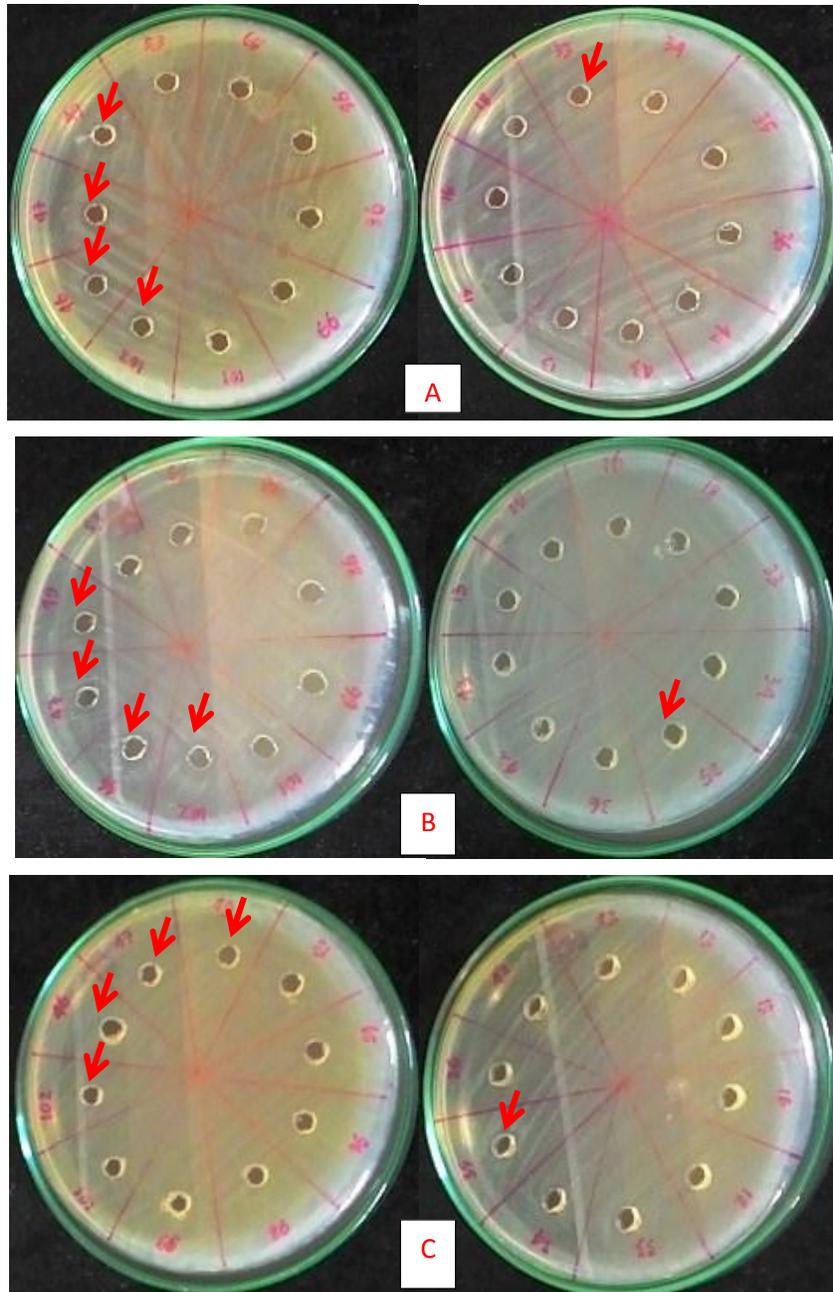
hambatan yang dihasilkan oleh *chloramphenicol* pada patogen uji (*E.coli*, *Stap. aureus* dan *Sal. typhi*), efektivitas penghambatan relatif isolat BAL yang diuji pada penelitian ini berada pada kisaran 16,66 daya hambat isolat BAL susu kambing dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 1.

Tabel 1. Hasil Uji Identifikasi BAL isolat susu kambing meliputi Katalase, Produksi Gas, Pewarnaan gram dan Morfologi

Isolat BAL	Morfologi Sel	Pewarnaan Gram	Katalase	Produksi Gas
GM 3, 6, 9,10, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 38, 39, 40, 41, 44, 45, 48, 50, 51, 52, 55, 63, 66, 68, 69, 70, 71, 74, 75, 76, 77, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 100	Bulat telur (<i>coccus</i>)	Warna ungu (Gram +)	Negatif	Negatif
GM 2, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 42, 43, 46, 47, 49, 53, 54, 56, 58, 62, 64, 65, 73, 78, 79, 80, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 102, 103	Bulat berantai (<i>coccus</i>)	Warna ungu (Gram +)	Negatif	Negatif

Tabel 2. Uji Daya Hambat BAL terhadap Bakteri Patogen Saluran Pencernaan

Kode Isolat	Diameter Zona Hambat (mm)								
	Supernatan Bebas Sel (SBS) Asam						SBS Netral		
	<i>E.coli</i>	Efektivitas Penghambatan %	<i>Stap.aureus</i>	Efektivitas Penghambatan %	<i>Sal.typhi</i>	Efektivitas Penghambatan %	<i>E.coli</i>	<i>Stap. aureus</i>	<i>Sal. typhi</i>
GM35	8.33	16.66	7.33	33.32	7.33	16.66	0	0	0
GM46	9.00	18.00	7.63	34.68	9.33	21.20	0	0	0
GM47	8.83	17.66	7.63	34.68	7.63	17.34	0	0	0
GM49	8.63	17.26	7.63	34.68	8.57	19.48	0	0	0
GM102	9.00	18.00	7.00	31.82	7.63	17.34	0	0	0



Gambar 1. Daya Hambat SBS Asam dari BAL Isolat Susu Kambing terhadap *E.coli* (A), *Stap.aureus* (B) dan *Sal.typhi* (C). Penghambatan ditunjukkan oleh Terbentuknya Zona Bening disekitar Sumur (ditunjukkan oleh tanda panah)

Pada uji aktivitas antimikrobial, supernatan dari beberapa isolat yang diperoleh pada penelitian ini dapat menghambat patogen saluran pencernaan, seperti *E.coli*, *Stap.aureus* dan *Sal.typhi*. Mekanisme penghambatan yang dilakukan oleh isolat BAL terhadap ketiga bakteri patogen saluran pencernaan uji disebabkan asam laktat ataupun hidrogen peroksida yang

dihasilkan oleh BAL selama proses fermentasinya. Hal ini ditunjang oleh hasil assay yang dilakukan pada penelitian ini, dimana aktivitas penghambatan terhadap patogen tidak tampak setelah pengaruh asam dari supernatan isolat BAL dihilangkan melalui netralisasi dengan NaOH. Hasil penelitian ini menunjang hasil yang dilaporkan oleh Rozila *et al.*, (2012) yang menyatakan bahwa BAL dari susu kambing memiliki aktivitas antimikrobial terhadap bakteri Gram positif (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogene*) maupun bakteri gram negatif (*E.coli* O157, *E.coli* V517, *Salmonella typhi* dan *Enterobacter aerogenes*) dengan zona hambatan antara 8 sampai 25 mm.

Asam laktat merupakan produk hasil fermentasi glukosa dari BAL. Asam laktat dilepaskan oleh BAL ke dalam medium tumbuh, sehingga menyebabkan menurunnya pH lingkungan pada medium tumbuh. Menurut Buckle *et al.* (2007), sebagian besar produk asam dapat menurunkan pH lingkungan (substrat) antara 3,5 – 4,5. Pelezar and Chan (2007), melaporkan bahwa umumnya bakteri patogen tidak mampu tumbuh pada pH lingkungan yang rendah (asam). Bakteri patogen umumnya tumbuh pada kisaran pH 6,0 – 8,0, sehingga banyak bakteri patogen mengalami kematian pada uji ini yang ditunjukkan oleh terbentuknya zona hambatan pada daerah *lawn* dari patogen uji (Gambar 1).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan bahwa terdapat 5 BAL isolat susu kambing yaitu GM35, GM46, GM47, GM49, GM102 yang mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen saluran cerna *E.coli*, *Stap. aureus* dan *Sal. typhi*, kelima isolat dapat dikembangkan potensinya sebagai kandidat probiotik isolat lokal untuk meningkatkan derajat kesehatan manusia.

Daftar Pustaka

- Begley, M.C.H. and C.G.M.Gahan. 2006. Bile salt activity in probiotic. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (3) : 1729-1738.
- Buckle, k.A., R.A.Edwards, G.H.Flee and M.Wootton.2007. Ilmu Pangan. (Hari Purnomo dan Adiono). Jakarta : Universitas Indonesia.
- Drisko, J.A., C.K.Giles and B.J. Bischoff. 2003. Probiotic in health maintenance and disease prevention. *Alternative Medicine Review* 8 (2):143-155.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food, report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in Man and Animals. *Journal Applied Bacteriology* 66. 365-378.
- Hirayama, K. and Rafter. 1999. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention : mechanistic consideration. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76 : 391-394.
- Isolauri, E, Rautava S., Kaliomakki M., Kirjavainen P. and Salminen S. 2002. Role of probiotics in food hypersensitivity. *Curr. Opin. Allergy Clin immunol* 2: 263-267.
- Kaliomakki M., Salminen S., Pussa T., Arvilommi H and Isolauri. 2003. Probiotics and prevention of atopic disease : a randomised placebo – cotrolled trial. *The Lancet* 361: 1869-1871.

- Kiani, L. 2006. Bugs in our guts- not all bacteria are bad: how probiotics keep us healthy. discovery guides, CSA.
- Kusmiati dan M. Amarila. 2002. Aktivitas Bakteriosin dari Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* Pbac1 Pada Berbagai Media. *Journal Makara Kesehatan*. 1(6): 1-7.
- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada. hal: 33-35.
- Lisal, J.S. 2005. Konsep probiotik dan prebiotik untuk modulasi mikrobiota usus besar, Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin SMF ANAK RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo, Makasar, *Jurnal Med. Nus*. 26 (4).256-262.
- Marteau, P.R., de Vrese M., Cellier C.J., and Schrezeenmier J. 2001. Protection from gastrointestinal disease with the use of probiotics. *Am.J.Clin. Nutr.* 73: 430S-436S.
- Pato, U. 2003. Potensi Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Dadih Untuk Menurunkan Resiko Penyakit Kanker. *Journal Natur Indonesia*. 2(5): 162-166.
- Pelezar, M.J. and E.C.S. Chan. 2007. Dasar-dasar mikrobiologi. Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Portugal, L.R., J.L. Goncalves, L.R. Fernandes, H.P.S Silva, R.M.E.Arantes, J.R.Nicoli, L.Q. Veira and J.I.A. Retes. 2006. Effect of *Lactobacillus delbrueckii* on Cholesterol Metabolism in Germ Free Mice and On Antherogenesis in Apolipoprotein E Knock Out Mice. *Brazilian Journal Medical and Biological Research* 39 : 629-935.
- Prangdimurti, E. 2001. Probiotik Dan Efek Perlindungannya Terhadap Kanker Kolon. Makalah Falsafah Sains Program Pasca Sarjana/S3. IPB. Bogor.
- Reid G., Howard J.and Gan B.S. 2001. Can bacterial intefrence prevent infection? *Trends in Microbial* 9: 424-427.
- Rozila, I., S. Esni, M.N.Lani, M.D. Sharina, M. S. Hasmah, H. Asma and M.D. Sharida. 2012. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated fom goats milk. International Annual Symposium on Sustainability Science and Management Terengganu, Malaysia.
- Saarela, M, Lahteenmaki, L., Crittenden, R., Salminen, S., Mattila-Sandholm, T. 2002. Gut bacteria and health foods the european perspective. *International Journal of Food Micribiology*, 78 : 99-117.
- Sperber, W.H., and Swan, J. 1976. Hot-Loop Test for Determination of Carbon Dioxide Production from Glucose by Lactic Acid Bacteria. *Appl and Eviron Microbiol*. 3(6): 990-991.
- Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P.B., and Ross, R.P. 2001. Market potensial for probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 476S-483S.
- Sujaya, N., Y. Ramona, N.P Widarini, N.P Suarini, M.U Dwipayanti, K.A Nociantari, dan N.W Nursini. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Susu Kuda Sumbawa. *Journal Veteriner*. 9(2): 52-59.
- Ramona, Y. 2003. Assessment of Some Antagonists to Fungal Plant Pathogens and Development of Methods for Their Large Scale Cultivation. Ph.D.Thesis.School of Agricultural Science The University Of Tasmania Australia.