

PENGEMBANGAN ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT AST 6 DARI SALURAN PENCERNAAN IKAN SEBAGAI AGENSIA PROBIOTIK

DEVELOPING OF AST 6 LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM THE TRACTUS DIGESTIVUS OF FISH AS A PROBIOTIC SUBSTANCE

Astuti*), Zaenal Bachruddin**), Supadmo**), Eni Harmayani****)
) F MIPA UNY, **)Fak. Peternakan UGM, ***)Fak. Teknologi Pertanian UGM

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengembangan isolat bakteri asam laktat AST 6 dari saluran pencernaan ikan sebagai agensia probiotik dan juga untuk mengetahui pengaruh penggunaan inokulum mikroba Bakteri Asam Laktat AST 6 terhadap daya tahan medium yang mengandung garam empedu. Garam empedu dengan konsentrasi 0%; 0,05%; 0,10%; 0,15%; dan 0,20% ditambahkan dalam medium MRS yang ditumbuhi BAL AST 6 dengan masing-masing tiga ulangan. Pertumbuhan BAL dievaluasi setiap jam berdasarkan perubahan densitas, penurunan pH maupun kecepatan tumbuh spesifiknya. Produksi asam laktat diukur pada puncak fase eksponensial. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis variansi dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola searah, dan jika terdapat perbedaan di antara reratanya maka dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat BAL AST 6 dari saluran pencernaan ikan toleran terhadap garam empedu sampai pada konsentrasi 0,15%. Penambahan garam empedu 0,15% dan 0,20 % secara nyata ($p < 0,05$) menurunkan densitas biomassa pada jam ke-22 dari 0,982 (tanpa garam empedu) menjadi 0,802 dan 0,808. Kecepatan tumbuh spesifik mulai menurun secara berturut-turut dari 0,0974 menjadi 0,0838; 0,0765; 0,0510; dan 0,0589 g BK sel/jam. Garam empedu berturut-turut secara nyata ($p < 0,05$) juga menurunkan produksi asam laktat pada jam ke-21 dari 0,645 menjadi 0,477; 0,361; 0,376; dan 0,352 mg/ml. Penurunan pH secara nyata ($P < 0,05$) terjadi pada jam ke-22 pada semua konsentrasi garam empedu. Kesimpulannya bahwa isolat BAL AST 6 dari saluran pencernaan ikan masih mampu tumbuh sampai konsentrasi garam empedu 0,15% dan dapat berpotensi sebagai agensia probiotik.

Kata kunci : Bakteri asam laktat, Garam empedu, Probiotik, Densitas, pH, Kecepatan tumbuh spesifik, Asam laktat

ABSTRACT

The aims of this research were to know the tolerance of AST6 lactic acid bacteria isolated from the tractus digestivus of indigenous fish to bile salt as one of probiotic condition and to know the effect of inoculum usage from AST6 lactic acid bacteria into the resistance of the medium containing bile salt. The bile salt with the concentration of 0%, 0.05%, 0.10%, 0.15%, and 0.20% were added to MRS medium which were done in three replicates. The growth of lactic acid bacteria were evaluated every hour based on the changes of biomass density, the decreasing of pH, and spesific growth rate. Lactic acid production were measured at the peak of exponential phase. The data obtained were analyzed with analysis of variance using Completely Randomized Design (CRD) and the different variable values affected by the treatments were analyzed by Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Lactic acid bacteria isolated from the tractus digestivus of fish were tolerance of bile salt, although there was an inhibition effect at the concentration of 0.15%. The addition of 0.15% and 0.20 % bile salt significantly ($p < 0.05$) decreased the biomass density at the 22nd hour from 0.982 (without bile salt) to 0.802 and 0.808 respectively. The spesific growth rate reduced from 0.0974 to 0.0838, 0.0765, 0.0510, and 0.0589 g cell/hour (DM bases). Lactic acid production at 21st hour significantly ($p < 0.05$) decreased as the effect of the addition of bile salt from 0.645 to 0.477, 0.361, 0.376, and 0.352 mg/ml. The value of pH decreased significantly ($p < 0.05$) up to 22 hour in all of the concentration. It could be concluded that the lactic acid bacteria isolated from the digestivus tractus of fish were tolerance of 0.15% bile salt concentration.

Key word : Lactic acid bacteria, Bile salt, Probiotic, Density, pH, Spesific growth rate, Lactic acid

PENDAHULUAN

Peran penting mikrobia saluran pencernaan serta manfaatnya bagi kesehatan telah lama diketahui. Keseimbangan antara mikrobia yang bermanfaat dan mikrobia patogen merupakan faktor penting dalam menentukan produk dan kesehatan ternak. Mempertahankan keseimbangan adalah hal yang tidak mudah dikarenakan pola pakan yang berubah. Salah satu cara mengatasi masalah tersebut adalah dengan pemberian probiotik (Widodo, 2003).

Saluran pencernaan penting sekali bagi kesehatan tubuh manusia dan hewan ternak. Fungsi utama saluran pencernaan adalah mencerna dan mengabsorpsi nutrisi agar kebutuhan tubuh dapat terpenuhi. Saluran pencernaan dapat dikatakan sehat apabila mukosa usus mampu mengabsorpsi mikronutrien penting dan menolak toksin serta patogen. Saluran pencernaan termasuk salah satu jaringan mukosa yang merupakan "pintu gerbang" masuknya infeksi mikroba paling luas permukaannya, sekitar dua pertiga sistem imun berada dalam saluran pencernaan (Inggrid, 2004). Keseimbangan antara bakteri-bakteri yang menguntungkan dan merugikan dalam saluran pencernaan menjadi salah satu kunci keberhasilan demi menciptakan kehidupan yang sehat bagi manusia dan produksi yang tinggi bagi hewan ternak.

Menurut Inggrid (2001) banyak peneliti telah membuktikan pentingnya peranan mikroflora atau bakteri saluran pencernaan bagi kesehatan, di antaranya adalah bakteri asam laktat. Bakteri ini berperan positif dalam menjaga keseimbangan mikroflora usus serta membantu meningkatkan sistem kekebalan tubuh, yang dikenal sebagai efek probiotik. Salah satu genus bakteri asam laktat yang terdapat dalam saluran pencernaan manusia dan hewan adalah *Streptococcus*. Genus *Streptococcus* tersebut banyak digunakan untuk meningkatkan kesehatan hewan ternak (Dunne *et al.*, 2001).

Streptococcus sp dapat memfermentasikan berbagai karbohidrat dan produk fermentasinya sebagian besar berupa asam laktat. Oleh karena itu, *Streptococcus* sp bersifat homofermentatif (Widodo, 2003).

Streptococcus sp adalah salah satu jenis bakteri asam laktat (BAL) yang dapat digunakan sebagai probiotik namun tidak semua BAL bersifat probiotik dan hanya jenis BAL tertentu saja yang menempati saluran pencernaan. Menurut Inggrid (2001) BAL dapat digunakan sebagai probiotik karena mampu menghasilkan senyawa antibakteri yaitu asam organik (asam laktat, asetat, propionat dan formiat), H_2O_2 , diasetil dan bakteriosin. Keberadaan senyawa antibakteri ini di dalam saluran pencernaan dapat menekan pertumbuhan mikrobia patogen sehingga dapat meningkatkan keseimbangan mikrobia di dalam saluran pencernaan ikan.

Probiotik sendiri berasal dari bahasa Latin yang berarti "untuk kehidupan", disebut juga "bakteri bersahabat", "bakteri menguntungkan", "bakteri baik" atau "bakteri sehat". Apabila didefinisikan secara lengkap, probiotik adalah kultur tunggal atau campuran dari mikroorganisme hidup yang diberikan ke manusia atau hewan akan berpengaruh baik, karena dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen yang ada di usus manusia atau hewan (Mulyorini, 2006).

World Health Organization (WHO) menyatakan bahwa probiotik secara umum ditargetkan untuk menjaga keseimbangan mikroflora usus sehingga dapat menjaga kesehatan saluran cerna (Mulyorini, 2006). Probiotik yang selama ini digunakan telah terbukti dapat meningkatkan produktivitas ternak karena dapat mengembalikan keseimbangan bakteri (rasio antara bakteri patogen dan nonpatogen) dalam saluran pencernaan ternak terutama dalam usus (Komang dkk., 2001).

Gohrand (Muttaqin, 2005) menyatakan bahwa bakteri asam laktat termasuk *Streptococcus* sp harus mampu tumbuh pada konsentrasi garam empedu sampai 1000 ppm dan mampu hidup dalam suhu badan ayam sekitar 40-41°C. Persyaratan tersebut digunakan sebagai standar pertimbangan daya toleran bakteri terhadap garam empedu.

Garam empedu adalah sebuah senyawa amphipatik, salah satu sisinya dapat larut dalam air (polar/ *hydrophilic*) dan sisi yang lainnya tidak larut dalam air (nonpolar/ *hydrophobic*)

(Saunders, Rubin dan Ostrow, 2005). Struktur amphipatik inilah yang menyebabkan garam empedu mampu mengemulsifikasi lemak dan secara langsung mempengaruhi kehidupan mikroorganisme dalam saluran pencernaan khususnya ketika berada di usus halus.

Keberadaan garam empedu bagi mikroorganisme di dalam usus halus dapat juga disebut sebagai "*Biological detergents*" yaitu cairan yang memiliki kemampuan untuk melarutkan fosfolipid, kolesterol dan protein. Sebagian besar dari senyawa tersebut adalah penyusun membran sel, sehingga menyebabkan sel mikroorganisme menjadi hancur (*lysis*). Konsentrasi garam empedu yang tinggi akan menjadi racun dan zat antimikrobia yang sangat keras. Fuller (Oh *et al.*, 2000) menyatakan bahwa probiotik adalah mikrobia hidup yang diberikan sebagai pakan tambahan (*feed supplement*) yang mempunyai pengaruh penting pada kesehatan baik pada manusia maupun pada hewan dengan memperbaiki keseimbangan mikrobia usus halus.

Syarat-syarat mikrobia probiotik antara lain bakteri tersebut mampu menjadi bagian dari mikrobia normal yang berada dalam saluran pencernaan, mampu melekat, dan membuat koloni dalam saluran intestinum (Oh *et al.*, 2000).

Gilliland (Oh *et al.* 2000) menerangkan bahwa saluran pencernaan manusia maupun hewan merupakan lingkungan yang sangat keras bagi pertumbuhan mikrobia, karena mengandung getah lambung, enzim-enzim pencernaan, dan asam empedu. Kondisi tersebut secara nyata mempengaruhi kehidupan strain probiotik. Menurut Bezkorovainy (2001) Keberadaan asam empedu unkonjugat merupakan agen *bacterial lysing* yang lebih baik dibanding dengan asam empedu konjugat. Semakin meningkatnya konsentrasi garam empedu akan meningkatkan pembentukan asam empedu unkonjugat yang dapat menghambat pertumbuhan BAL.

Ikan tawes (*Puntius javanicus*) merupakan salah satu ikan air tawar yang mudah dibudidayakan, murah harganya dan mudah diperoleh. Dalam penelitian ini digunakan isolat BAL dari saluran pencernaan ikan tawes sebagai sumber mikroorganisme

penghasil asam laktat. Berdasarkan uraian tersebut maka perlu dilakukan uji ketahanan bakteri asam laktat dari saluran pencernaan ikan terhadap garam empedu. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar penelitian selanjutnya mengenai BAL khususnya genus *Streptococcus* yang telah terseleksi oleh garam empedu. Bakteri *Streptococcus* sp yang mampu tumbuh dan bertahan dalam medium garam empedu dapat direkomendasikan sebagai agensia probiotik

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengembangan isolat bakteri asam laktat AST 6 dari saluran pencernaan ikan sebagai agensia probiotik dan juga untuk mengetahui pengaruh penggunaan inokulum mikrobia Bakteri Asam Laktat AST 6 terhadap daya tahan medium yang mengandung garam empedu.

Penelitian ini merupakan studi dasar yang diharapkan dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan penelitian selanjutnya untuk mengembangkan bakteri asam laktat dari saluran pencernaan ikan menjadi agensia probiotik.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dimulai pada bulan Mei 2004 sampai dengan bulan Juni 2005 di Laboratorium Biokimia Nutrisi, Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada.

Isolat BAL dari saluran pencernaan ikan tawes (*Puntius javanicus*).

Bahan kimia yang digunakan adalah MRS Broth (Pronadisa), glukosa, aquades, NaOH dan HCl untuk penepatan pH, alkohol 70%, spiritus, bahan-bahan penyusun medium basal, reagen penentuan kadar asam laktat, gas CO₂, dan garam empedu (*Bile salt* merk Oxoid).

Peralatan yang digunakan antara lain oven, Spektrofotometer merk *Genesis 20*, timbangan analitik merk *Sartorius*, pH meter merk *Hana*, *waterbath*, sentrifuge, *freezer*, pipet mikro, *magnetic steerer*, tabung *hungate*, botol volume 500 ml, spet, fortek, alat-alat gelas, autoklav, dan laminar.

Uji ketahanan terhadap garam empedu hanya dilakukan pada isolat BAL unggul

terseleksi dengan menggunakan medium cair MRS broth (Pronadisa) yang mengandung substrat dekstrin 2% dengan system *batch fermentation*. Isolat BAL yang sudah aktif ditumbuhkan terlebih dahulu dalam medium pengkayaan dengan menggunakan MRS broth selama 24 jam kemudian diinokulasikan sebanyak 1% (v/v) ke dalam medium cair MRS broth volume 250 ml dengan perlakuan konsentrasi garam empedu (*Bile salt* merk Oxoid) yaitu 0%; 0,05%; 0,10%; 0,15%; dan 0,20%. Masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali ulangan, kemudian diinkubasi pada suhu 39°C selama 22 jam dan diamati pertumbuhannya dengan mengukur *optical density* (OD) dengan menggunakan Spektrofotometer merk *Genesis 20*, dengan panjang gelombang 650 nm (Pereira dan Gibson, 2002). Pengamatan dilakukan tiap jam dengan melakukan pengambilan sampel sebanyak 3 ml dari setiap ulangan dengan menggunakan spet sampai diperoleh perubahan densitas yang cenderung konstan pada jam yang berbeda. Sampel yang telah diketahui densitasnya diukur pH-nya dengan menggunakan pH meter (Plummer, 1987) kemudian disimpan dalam ependorf untuk dilakukan penentuan produksi asam laktat untuk memastikan bahwa turunnya pH medium disebabkan oleh tingginya produksi asam laktat. Pengukuran produksi asam laktat dilakukan dengan menggunakan metode Baker and Summerson (Hawk's, 1976).

Variabel

Uji ketahanan Terhadap Garam Empedu yang diamati

- (1). Pola pertumbuhan BAL dalam medium yang mengandung garam empedu diperoleh dengan mengamati perubahan densitas pada tiap jam pengamatan
- (2). Kecepatan tumbuh spesifik isolat BAL dalam medium yang mengandung garam empedu diperoleh dari slope pertumbuhan pada fase eksponensial.
- (3). Pengukuran terhadap produksi asam laktat hanya dilakukan setelah fase eksponensial untuk meyakinkan bahwa turunnya pH medium disebabkan oleh tingginya

persentase asam laktat dalam medium sehingga semakin menguakan bahwa mikrobia tersebut adalah bakteri penghasil asam laktat. Kadar asam laktat dapat dihitung berdasarkan persamaan standard asam laktat.

- (4). Penurunan pH BAL pada medium yang mengandung garam empedu pada tiap titik pengamatan diukur dengan menggunakan pH meter.

Pola pertumbuhan, kecepatan tumbuh spesifik, penurunan pH, dan produksi asam laktat pada uji ketahanan terhadap garam empedu dianalisis dengan analisis variansi menggunakan Rancangan Acak Lengkap atau CRD (*Completely Randomized Design*) pola searah dan kemudian apabila menunjukkan adanya perbedaan dilanjutkan dengan uji beda mean DMRT (*Duncan's New Multiple Range Test*)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Ketahanan Terhadap Garam Empedu

Pola Pertumbuhan. Rata-rata hasil pengamatan pola pertumbuhan BAL dalam medium yang mengandung garam empedu dengan konsentrasi berbeda dapat dilihat pada Tabel 1.

Data dalam tabel 1 menunjukkan adanya peningkatan densitas secara signifikan ($p < 0,05$) sejalan dengan lamanya waktu inkubasi. Hal ini menunjukkan adanya pertumbuhan BAL di dalam medium yang mengandung garam empedu. Semua konsentrasi sampai jam pertama tidak terdapat peningkatan densitas yang signifikan, pada konsentrasi 0,05% dan 0,1% terjadi sampai inkubasi jam kedua sedangkan pada konsentrasi 0,15% baru terjadi peningkatan densitas secara nyata pada inkubasi jam ke-5. Hal ini menunjukkan adanya fase adaptasi BAL terhadap nutrisi dan kondisi lingkungan medium.

Tabel 1. Rerata densitas pertumbuhan BAL pada medium garam empedu

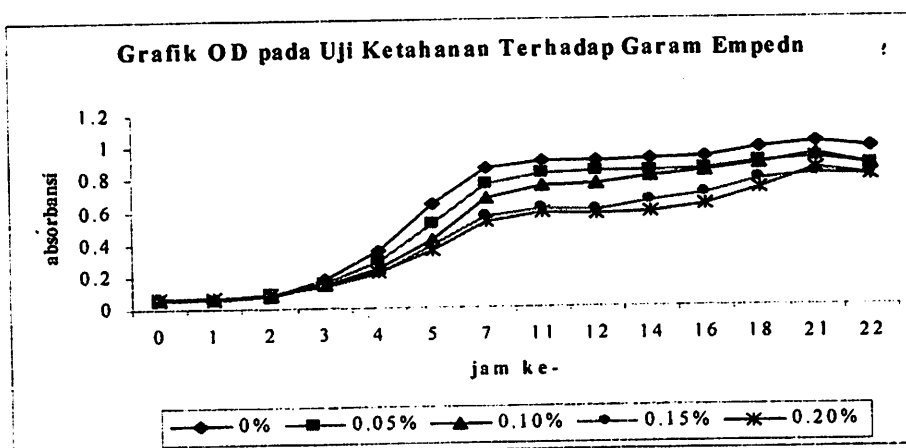
jam ke-	konsentrasi garam empedu (%)				
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20
0	0,050 ^a	0,060 ^a	0,053 ^a	0,063 ^a	0,067 ^a
1	0,054 ^a	0,059 ^a	0,055 ^a	0,060 ^a	0,066 ^a
2	0,079 ^b	0,083 ^a	0,078 ^a	0,084 ^a	0,092 ^b
3	0,171 ^c	0,158 ^b	0,144 ^b	0,137 ^a	0,144 ^c
4	0,336 ^d	0,283 ^c	0,243 ^c	0,214 ^a	0,225 ^d
5	0,637 ^c	0,512 ^d	0,413 ^d	0,389 ^b	0,352 ^c
7	0,856 ^f	0,762 ^c	0,667 ^c	0,560 ^c	0,529 ^f
11	0,903 ^B	0,828 ^f	0,745 ^f	0,611 ^c	0,586 ^B
12	0,907 ^{gh}	0,832 ^f	0,763 ^{fg}	0,599 ^c	0,572 ^B
14	0,918 ^{gh}	0,835 ^f	0,809 ^{gh}	0,650 ^{cd}	0,587 ^B
16	0,929 ^h	0,848 ^{fg}	0,832 ^{hi}	0,693 ^{cd}	0,629 ^h
18	0,980 ⁱ	0,893 ^g	0,886 ^{ij}	0,778 ^d	0,725 ⁱ
21	1,013 ⁱ	0,913 ^h	0,937 ^j	0,812 ^d	0,846 ^j
22	0,982 ^j	0,865 ^h	0,866 ^k	0,802 ^d	0,808 ^k

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Menurut Madigan et al. (1988) pola pertumbuhan mikrobial terdiri atas 4 fase, yaitu fase lambat (*lag phase*) yang sering disebut fase adaptasi karena mikrobial sedang beradaptasi dengan lingkungan medium baru tempat BAL tumbuh. Fase kedua adalah fase eksponensial (*exponential phase*) ditandai pertumbuhan yang sangat cepat dari sel dan produk fermentasi. Fase ketiga adalah fase stasioner (*stationary phase*) ditandai dengan pertumbuhan sel tetap, atau sebagai titik mulai turunnya pertumbuhan disertai dengan produk primernya. Fase terakhir adalah fase kematian (*death phase*). Fase ini terjadi apabila waktu inkubasi dilanjutkan

setelah fase pertumbuhan sudah mencapai fase stasioner, ditandai dengan sel bakteri akan mengalami lisis.

Fase adaptasi berakhir setelah mulai terjadi peningkatan densitas secara signifikan ($p < 0,05$) hingga mencapai puncak fase eksponensial pada inkubasi jam ke-11. Densitas mulai stabil jam ke-12, pada semua konsentrasi penambahan garam empedu yang diikuti dengan penurunan densitas pada jam ke-22. Hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan BAL telah memasuki fase stasioner yaitu pertumbuhan sudah mulai konstan



Gambar 1. Pertumbuhan BAL dalam medium yang mengandung garam empedu

Penurunan absorbansi pada jam ke-22 yang telah dianalisis menunjukkan bahwa garam empedu mampu menurunkan absorbansi medium pertumbuhan BAL. Konsentrasi garam empedu 0,05% dan 0,10% belum terjadi penghambatan yang nyata akan tetapi mulai pada konsentrasi garam empedu 0,15% terjadi penghambatan pertumbuhan yang nyata ($p < 0,05$). Hal ini disebabkan karena garam empedu bersifat menghambat pertumbuhan BAL sehingga semakin tinggi konsentrasi garam empedu yang ditambahkan ke dalam medium maka pertumbuhan BAL akan semakin terhambat seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi. Menurut Brand *et al.* (Oh *et al.*, 2000) asam empedu menunjukkan efek penghambatan terhadap pertumbuhan mikrobia dan aktifitas penghambatan ini lebih besar dibanding dengan asam-asam organik lainnya.

Kecepatan Tumbuh Spesifik.

Kecepatan tumbuh spesifik merupakan kecepatan pertumbuhan per satuan jumlah

biomassa (Wang *et al.*, 1979). Kecepatan tumbuh spesifik diperoleh dari analisis regresi antara densitas dengan lama waktu inkubasi pada fase eksponensial sehingga diperoleh persamaan $y = a + bx$. Nilai b merupakan slope yang menunjukkan nilai kecepatan tumbuh spesifik, nilai x merupakan jam inkubasi, dan y merupakan densitas. Menurut Wang *et al.* (1979) peningkatan densitas medium mencerminkan peningkatan jumlah sel dimana $OD = 1$ setara dengan 1-1,5 gram BK sel.

Data pada Tabel 2 berikut ini diperoleh dari slope yang dihitung dengan estimasi bahwa $OD = 1$ setara dengan 1 gram BK sel. Penurunan kecepatan tumbuh spesifik tersebut menunjukkan bahwa adanya penambahan garam empedu dalam medium mampu menurunkan kecepatan pertumbuhan spesifik BAL secara signifikan ($p < 0,05$) dari 0,0974 g BK sel/jam menjadi 0,0838 g BK sel/jam; 0,0765 g BK sel/jam; 0,0510 g BK sel/jam; dan 0,0589 g BK sel/jam.

Tabel 2. Rerata kecepatan tumbuh spesifik BAL pada fase eksponensial

Konsentrasi Garam Empedu (%)	Kecepatan Tumbuh Spesifik (absorbansi/jam)	Kecepatan Tumbuh Spesifik (BK sel/jam)	Rerata (BK sel/jam)
0.00	0.0974	0.0974	0.0974 ^a
	0.0985	0.0985	
	0.0964	0.0964	
0.05	0.0841	0.0841	0.0838 ^b
	0.0832	0.0832	
	0.0842	0.0842	
0.10	0.0720	0.0720	0.0765 ^b
	0.0760	0.0760	
	0.0815	0.0815	
0.15	0.0631	0.0631	0.0510 ^c
	0.0457	0.0457	
	0.0442	0.0442	
0.20	0.0586	0.0586	0.0589 ^c
	0.0577	0.0577	
	0.0604	0.0604	

Superskrip yang berbeda pada kolom rerata menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Terjadi penurunan kecepatan tumbuh spesifik secara signifikan antara konsentrasi 0% (kontrol) dan konsentrasi 0,05%, sedangkan kecepatan tumbuh spesifik pada konsentrasi 0,05% tidak berbeda nyata dengan kecepatan tumbuh spesifik pada konsentrasi 0,1%

Kecepatan tumbuh spesifik konsentrasi

0,15 % tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 0,2 0%. Hal ini disebabkan pada konsentrasi 0,05% enzim *bile salt hidrolase* sudah mengalami kejenuhan akan substrat dalam menghasilkan asam empedu unkonjugat. Semakin meningkatnya konsentrasi garam empedu akan meningkatkan pembentukan asam

empedu unkonjugat yang dapat menghambat pertumbuhan BAL, hal tersebut berpengaruh langsung pada turunnya aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan BAL.

Produksi Asam Laktat. Pengukuran

Tabel 3. Rerata produksi asam laktat setelah fase eksponensial

Konsentrasi Garam Empedu (%)					
Ulangan	0	0.05	0.10	0.15	0.20
1	0.563	0.411	0.311	0.401	0.318
2	0.738	0.515	0.356	0.388	0.353
3	0.634	0.506	0.415	0.339	0.386
Rerata kadar laktat (mg/ml)	0.645 ^a	0.477 ^b	0.361 ^b	0.376 ^{bc}	0.352 ^c

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,05$)

Rerata produksi laktat terlihat menurun secara signifikan ($p < 0,05$) pada konsentrasi 0%, 0,05% dan 0,2%, masing-masing adalah 0,645, 0,477, dan 0,352. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi garam empedu akan mengakibatkan pertumbuhan BAL semakin terhambat sehingga akan semakin sedikit BAL yang melakukan fermentasi sehingga akan sedikit pula produk asam laktat yang dihasilkan. Semakin tinggi kadar laktat, maka semakin efektif mikrobia tersebut dalam memanfaatkan glukosa untuk membentuk asam laktat, makin cepat turunnya pH (Gilliland, 1990). Menurut Dune *et al.* (2001) bahwa asam empedu menunjukkan aktivitas antibakteri yang menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* strain, *Klebsiella* sp, dan *Enterococcus* sp secara *in vitro*. Menurut Brandt *et al.*, (Oh *et al.*, 2000) asam empedu menunjukkan efek penghambatan terhadap pertumbuhan mikrobia dan aktivitas penghambatan ini lebih besar dibanding dengan asam-asam organik lainnya.

Menurut Bezkorovainy (2001) bahwa resistansi probiotik terhadap garam empedu secara *in vitro* dapat dibagi menjadi dua tipe yaitu *survival* dan pertumbuhan. Variasi daya tahan (*survive*) diantaranya tergantung pada konsentrasi dan lamanya interaksi antara mikrobia dengan garam empedu. Penelitian lain mengenai pertumbuhan mikrobia dalam medium yang mengandung garam empedu

produksi asam laktat dilakukan untuk mengetahui jumlah asam laktat yang dihasilkan oleh BAL pada medium yang mengandung garam empedu.

menghubungkan dengan variabel lain yaitu keberadaan asam empedu *unconjugate* di dalam medium. Keberadaan asam empedu *unconjugate* merupakan agen *bacterial lysing* yang lebih baik dibanding dengan asam empedu konjugat. Proses penguraian garam empedu (*deconjugation*) dilakukan oleh enzim *bile salt hidrolase*, enzim tersebut diproduksi juga oleh *Lactobacilli* dan *Bividobacteria*. Dengan demikian semakin meningkatnya konsentrasi garam empedu akan meningkatkan pembentukan asam empedu unkonjugat yang dapat menghambat pertumbuhan BAL.

Keberadaan garam empedu dalam medium pertumbuhan BAL hanya bersifat sebagai inhibitor, BAL tersebut pada konsentrasi garam empedu sampai 0,20% masih menunjukkan pertumbuhan meskipun berbeda secara sangat nyata bila dibandingkan dengan kontrol (tanpa garam empedu).

Penurunan pH.

Pengukuran pH yang dilakukan pada jam ke 22 seperti terlihat pada tabel 5

Penurunan pH tersebut diakibatkan oleh terakumulasinya produk-produk fermentasi yang berupa asam laktat dan asam organik lainnya seperti asam asetat, dan asam propionat. Asam organik tersebut merupakan hasil akhir hidrolisis glukosa.

Hasil analisis variansi menunjukkan

bahwa seiring dengan bertambahnya konsentrasi garam empedu memberikan pengaruh yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap penurunan pH

sampai jam ke-22 yang terlihat pada Tabel 4 di bawah ini.

Tabel 4. Perubahan nilai pH selama fermentasi menggunakan isolat BAL dengan medium yang mengandung garam empedu pada jam ke-22

Konsentrasi Garam Empedu (%)					
Ulangan	0	0.05	0.10	0.15	0.20
1	4,16	4,45	4,59	4,82	4,87
2	4,14	4,46	4,64	4,87	4,90
3	4,14	4,43	4,65	4,86	4,95
Rerata	4,15 ^a	4,45 ^b	4,63 ^c	4,85 ^d	4,91 ^e

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,05$)

Pengaruh penambahan garam empedu yang signifikan ($p < 0,05$) masih terjadi sampai pada konsentrasi 0,20%. Semakin meningkat konsentrasi garam empedu dalam medium akan semakin menghambat pertumbuhan sehingga akan menyebabkan penurunan kemampuan BAL dalam menghasilkan produk akhir fermentasi yang berupa asam organik terutama asam laktat seperti yang terlihat dalam tabel rerata produksi asam laktat di atas (Tabel 3), sehingga penurunan pH semakin kecil.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa garam empedu memberikan pengaruh yang sangat nyata ($P < 0,05$) terhadap pH akhir fermentasi. Derajat keasaman akhir fermentasi semakin tinggi berbanding lurus dengan semakin tingginya konsentrasi garam empedu dalam medium.

Perbedaan rata-rata nilai pH berkaitan dengan penghambatan garam empedu terhadap pertumbuhan BAL. Penghambatan terhadap pertumbuhan menyebabkan kemampuan BAL menurun dalam menghasilkan produk akhir yang berupa asam organik terutama asam laktat. Asam-asam organik yang dihasilkan selama fermentasi sangat menentukan turunnya pH selama fermentasi. Pada konsentrasi garam empedu yang lebih tinggi pH akhir fermentasi juga lebih tinggi. Efek penghambatan garam empedu terhadap pertumbuhan BAL berakibat pada turunnya kemampuan BAL dalam menghasilkan produk akhir yang berupa asam-asam organik terutama asam laktat. Keberadaan asam-asam organik ini sangat berpengaruh pada

turunnya pH medium. Dengan semakin meningkatnya konsentrasi garam empedu dalam medium pertumbuhan menyebabkan efek penghambatan terhadap pertumbuhan BAL juga semakin meningkat (Tabel 3). Hal tersebut juga dapat dilihat pada Tabel 4, peningkatan konsentrasi garam empedu diikuti dengan peningkatan pH rata-rata medium.

Meskipun terjadi aktivitas penghambatan pertumbuhan oleh garam empedu, BAL masih mampu bertahan dan tumbuh dalam medium yang mengandung garam empedu sampai pada konsentrasi 0,20%. Hal tersebut dapat dilihat dengan semakin bertambahnya densitas (Tabel 1) dan semakin turunnya pH (Tabel 4) pada akhir jam pengamatan, meskipun menunjukkan perbedaan yang sangat nyata terhadap kontrol (tanpa garam empedu). Pada akhir pengamatan rata-rata pH medium dapat mencapai pH kritis yaitu sekitar 4, pada pH kritis ini mikobia patogen sudah tidak mampu bertahan (Gilliland, 1990). Menurut Pereira dan Gibson (2002) bahwa parameter kemampuan bertahan dan tumbuh pada pH 3,0 selama 2 jam dan tumbuh dalam medium yang mengandung 1.000 mg/l empedu digunakan sebagai standard pertimbangan daya tahan kultur mikrobial terhadap asam dan empedu.

Menurut Jack *et al.*; Montville dan Kaiser (Oh *et al.*, 2002) bahwa BAL memproduksi beberapa senyawa antimikrobia diantaranya asam-asam organik (asam laktat, asetat, propionat dan format). Kemampuan BAL dalam memproduksi asam organik ini

dicerminkan melalui turunnya pH medium, pada jam ke-22 rerata pH medium mencapai 4,15 dan pada konsentrasi garam empedu 0,20% BAL mampu menurunkan pH 4,91.

SIMPULAN

Penambahan garam empedu ke dalam medium pertumbuhan isolat BAL dari saluran pencernaan ikan menyebabkan perbedaan produksi biomassa (*optical density*) sampai konsentrasi 0,15%, tetapi penurunan kecepatan tumbuh spesifik inulai pada konsentrasi 0,05%. Pengaruh pada penurunan pH dimulai pada konsentrasi 0,15%, sedangkan penurunan kadar laktat dimulai pada konsentrasi 0,05%. Isolat BAL dari saluran pencernaan ikan tersebut masih mampu tumbuh sampai konsentrasi garam empedu 0,15%. Kesimpulannya bahwa isolat BAL AST 6 dari saluran pencernaan ikan masih mampu tumbuh sampai konsentrasi garam empedu 0,15% dan dapat berpotensi sebagai agensia probiotik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bezkorovainy, A. (2001). Probiotic: determinant of survival and growth in the gut. *American J. of Clinical Nutrition*. 73, 399-405.
- Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan, J.K. Collins. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *American Journal Clinis Nutrition* .73, 386-392.
- Gilliland, S. E. (1990). *Bacterial starter culture for food*. 5th ed. Florida: CRC Press Inc.
- Gilliland, S. E. and D. K. Walker. (1990). Factors to consider when selecting a culture of lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemia effect in human. *J. Dairy Sci.*, 73, 905-911.
- Hawk, P. B. (1976). *Physiological chemistry*. 14th Edition. Bernard L. Oser(ed). New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd,
- Inggrid S. (2001). *Efek probiotik, prebiotik dan synbiotik bagi kesehatan*. Kompas edisi 30 September 2001.
- Inggrid S. (2004). *Agar probiotik menyetatkan saluran cerna*. Kompas 5 April 2004.
- Komang, Wiryawan, G.dkk. (2001). *Isolasi bakteri asam laktat penghasil antimikroba*. Laporan Penelitian. IPB dalam <http://www.jvetunud.com/archives/60>. Diakses tanggal 12 April jam 15.28 WIB
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, J. Parker. (1988). *Brock biology of microorganisms*. 8th ed. Prentice Hall International, Inc
- Mulyorini, R. (2006). *Probiotik dalam* <http://www.republika.co.id>. Diakses tanggal 13 Januari 2006 jam 08.00 WIB
- Muttaqin, Ahmad. (2005). *Mempelajari pembuatan pelet probiotik bakteri asam laktat untuk suplemen pakan ternak ayam*. Skripsi. Yogyakarta: Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian UGM.
- Oh, S., S. H. Kim, dan R. W. Wirobo. (2000). Characterization and purification of bacteriocin produced by a potential probiotic cultur lactobacillus acidophilus 305c. *J. Dairy Sci.* 83, 2747-2752
- Pereira, D. I. A. and G. R. Gibson. (2002). Cholesterol assimilation by latic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human gut. *J. Appl. and Environ. Microbiol.* 68, 4689-4693
- Plummcr, D.T. (1987). *An introduction to practical biochemistry*. 3rd ed. McGraw W. Hill Book Company (UK) Limited Maiderhead. Berkshire. England.

- Saunders D.R., C.E. Rubin, dan J.D. Ostrow, (2005). *Small bowel; the gut course (HUBIO551) on line syllabus* dalam http://www.uwgi.org/gut/smallbowel_09.asp.
- Wang, D. I. C., C. L. Cooney, A. L. Demain, P. Dunnill, A. E. Humphrey, M. D. Lilly. (1979). *Fermentation and enzyme technology*. New York: John Wiley and Sons.
- Widodo. (2003). *Bioteknologi industri susu*. Yogyakarta: Lacticia Press.