

## **VIABILITAS BAKTERI ASAM LAKTAT ASAL ASI TERHADAP pH ASAM LAMBUNG DAN GARAM EMPEDU**

**Sri Sinto Dewi\*, Herlisa Anggraini \*\***

\* *Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang . E-mail: sintomun@yahoo.com Telp. 081904450863*

\*\* *Laboratorium Imunologi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang*

### **ABSTRAK**

Air susu ibu merupakan salah satu sumber bakteri asam laktat, yang berfungsi untuk menjaga keseimbangan mikroflora saluran pencernaan dan meningkatkan sistem kekebalan. Bakteri asam laktat sebagai probiotik berpeluang hidup pada saluran pencernaan jika berasal dari tubuh manusia, mempunyai ketahanan terhadap pH asam lambung dan garam empedu. Tujuan penelitian ini adalah seleksi dan isolasi bakteri asam laktat dari air susu ibu yang tahan terhadap pH dan garam empedu. Penelitian menggunakan 6 isolat bakteri asam laktat yang telah diisolasi dari air susu ibu. Masing-masing isolat diuji ketahanan terhadap pH rendah 1,5 sampai 6 dan garam empedu konsentrasi 1-5%. Hasil yang diperoleh terdiri dari 6 isolat bakteri asam laktat yang termasuk dalam genus *Lactobacillus* yang memiliki ketahanan terhadap pH rendah dan garam empedu. Isolat yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai probiotik sistem kekebalan adalah *Lactobacillus* isolat A.1 dan A.2

*Kata kunci : bakteri asam laktat, viabilitas asam lambung dan garam empedu*

## **PENDAHULUAN**

Mengonsumsi pangan fungsional yang mengandung probiotik, tubuh akan terbantu dalam menjaga keseimbangan mikroflora saluran pencernaan. Mikroorganisme yang berpeluang besar melintasi dan hidup pada saluran pencernaan adalah yang berasal dari tubuh manusia sendiri. Bayi yang mengonsumsi ASI memiliki 92 % bakteri asam laktat, jika mulai besar dan minum susu formula atau makanan lainnya jumlah bakteri berkurang menjadi 20 %. Sebaliknya jumlah bakteri patogen bertambah dari 4 menjadi 24 %, sehingga anak yang mulai besar banyak mengalami masalah dengan pencernaan.

Purwandhani dan Rahayu (2003) telah melakukan isolasi dan seleksi bakteri asam laktat dari fekal material bayi yang berpotensi sebagai agensia probiotik bertitik awal dari penelitian ini dapat diargumentasikan bahwa dalam ASI terdapat bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai probiotik. Dipertegas dengan penelitian Djide(2008) bahwa dalam air susu ibu laktasi ditemukan bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai probiotik, yang berpotensi untuk menurunkan kolesterol. Prangdimurti (2001), mensyaratkan mikroorganisme menjadi probiotik yang efektif dalam memberi efek kesehatan antara lain berasal dari manusia, mempunyai viabilitas yang tinggi untuk melalui saluran pencernaan. Karakteristik isolat yang berpotensi sebagai probiotik adalah tahan terhadap asam lambung dan tahan terhadap garam empedu usus halus sehingga dapat bertahan dalam usus besar. Dapat menempel/melekat pada sel intestinal, berkolonisasi di saluran pencernaan manusia, memproduksi senyawa anti-bakteri, dapat melawan bakteri patogen dan bersifat antikarsinogen (Evanikastrri,2003).

Beberapa peneliti melaporkan bahwa sifat positif dari probiotik bagi kesehatan adalah meningkatkan ketahanan terhadap infeksi pencernaan, mempengaruhi respon imun, menurunkan kolesterol, menurunkan hipertensi, mengurangi intoleran laktosa, bersifat antimutagen, dan antikanker ( Kusumawati, 2002 )

Sehingga perlu dilakukan pembuktian dengan viabilitas bakteri asam laktat asal ASI terhadap pH dan garam empedu untuk mendapatkan probiotik yang dapat meningkatkan sistem kekebalan. Yang pada akhirnya probiotik isolat ASI dapat digunakan sebagai imunostimulan.

Tujuan penelitian adalah untuk melakukan seleksi dan karakterisasi bakteri asam laktat isolat ASI terhadap lingkungan pH lambung ( pH 2 ) dan usus ( pH 6-7 ) serta ketahanan terhadap garam empedu 1-5%

## **METODE PENELITIAN**

### **Sampel Penelitian**

Sampel penelitian adalah air susu ibu laktasi yang berumur 5 hari sampai 2 bulan dari rumah bersalin

### **Kultur air susu ibu dan Isolasi bakteri**

**Kultur air susu ibu.** Kultur ASI menggunakan media *de Man, Rogosa, Sharpel* (MRS) cair, air susu ibu sebanyak 5 ml diinokulasikan ke dalam media *de Man, Rogosa, Sharpel* (MRS, OXOID) cair secara aseptik dihomogenkan dengan cara digoyang dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian dikultur pada media *de Man, Rogosa, Sharpel* (MRS) agar yang ditambahkan CaCO<sub>3</sub> 1% dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C dengan kondisi anaerob menggunakan anaerobik jar, kemudian dilakukan subkultur/isolasi bakteri.

**Tahap isolasi/ subculture.** Setelah dilakukan kultur pada media MRS agar CaCO<sub>3</sub> 1%, kemudian dilakukan pengamatan morfologi koloni bakteri asam laktat yaitu adanya zona bening (clear zone) disekitar koloni, pada setiap 3 koloni terpilih meliputi: warna koloni, bentuk, diameter, tepi, elevasi. Koloni bakteri terpilih kemudian diisolasi secara bertingkat beberapa kali sampai diperoleh kultur murni, koloni bakteri dicat dengan pengecatan gram dan ditanam pada media MRS agar miring serta MRS agar tegak untuk disimpan pada suhu 4°C sebagai stok.

**Uji karakteristik.** Karakterisasi dilakukan dengan berbagai pengujian/ pengamatan pada media MRS yang ditambah CaCO<sub>3</sub> 1%, inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 2-3 hari pada kondisi anaerob. Zona jernih yang terbentuk di sekitar koloni bakteri diduga bakteri asam laktat. Selanjutnya dilakukan pewarnaan Gram menurut metode Hucker dan Conn didapatkan hasil bakteri bentuk batang dengan sifat Gram positif dan uji katalase untuk mendapatkan bakteri *Laktobacillus* dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Reaksi katalase memberikan hasil negatif apabila diteteskan pada sel bakteri yaitu tidak menunjukkan adanya busa atau buih setelah 1 menit. Non motil, Uji fermentasi karbohidrat glukosa (homofermentatif).

**Uji Viabilitas bakteri asam laktat sebagai probiotik.** Pengujian dilakukan dengan dua jenis pengujian yaitu uji ketahanan terhadap pH yaitu dengan menggunakan media MRS cair yang diatur pH dengan perlakuan pH 1,5; pH 2; pH 2,5; pH 3 sampai dengan pH 6 menggunakan pH-meter sebanyak 5 mL. Masing masing perlakuan diinokulasi dengan kultur bakteri asam laktat/ bakteri uji sebanyak 10% dari volume media. Sebagai kontrol adalah media MRS cair tanpa penambahan bakteri. Setelah diinkubasi selama 24, 48, 72, dan 96 jam pada suhu 37 °C dilakukan hitung kuman pada media MRS agar yang ditambah CaCO<sub>3</sub> 1%, secara surface plate (permukaan) untuk mengetahui jumlah bakteri yang tahan terhadap pH. Uji ketahanan terhadap garam empedu dengan media MRS cair yang ditambah dengan ox gall 1% hingga 5%. Masing masing perlakuan diinokulasi dengan bakteri asam laktat/bakteri uji sebanyak 10% dari volume media. Sebagai kontrol adalah media MRS cair tanpa penambahan bakteri. Setelah diinkubasi selama 24, 48, 72, dan 96 jam pada suhu 37 °C dilakukan hitung kuman pada media MRS agar yang ditambah CaCO<sub>3</sub> 1%, secara surface plate (permukaan) untuk mengetahui jumlah bakteri yang tahan terhadap garam empedu. Diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C pada kondisi anaerob.

## HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Kultur air susu ibu yang berumur 5 hari sampai 2 bulan sebanyak 2 sampel menggunakan media MRS cair, yang kemudian diisolasi didapatkan hasil 6 isolat bakteri asam laktat. Isolasi bakteri asam laktat pada media MRS agar yang ditambah  $\text{CaCO}_3$  1% membentuk koloni putih dengan zona bening disekitar koloni setelah diinkubasi 1-2 hari, asam yang dihasilkan oleh bakteri akan bereaksi dengan  $\text{CaCO}_3$  sehingga menghasilkan Ca- laktat yang larut dalam media dan terlihat zona bening.

Tabel 1. Hasil Karakteristik isolat bakteri asam laktat ASI

Isolat	Pertumbuhan MRS agar $\text{CaCO}_3$ 1%( Anaerob )	Morfologi sel	Uji katalase
A.1	Koloni putih, clear zone disekitar koloni	Batang, Gram positif	Negatif
A.2	Koloni putih, clear zone disekitar koloni	Batang, Gram positif	Negatif
A.3	Koloni putih, clear zone disekitar koloni	Batang, Gram positif	Negatif
B.1	Koloni putih, clear zone disekitar koloni	Batang, Gram negatif	Negatif
B.2	Koloni putih, clear zone disekitar koloni	Batang, Gram positif	Negatif
B.3	Koloni putih, clear zone disekitar koloni	Batang, Gram positif	Negatif

Hasil karakteristik isolat bakteri asam laktat ( Tabel 1 ) didapatkan 6 isolat bakteri asam laktat pertumbuhan pada media MRS agar  $\text{CaCO}_3$  1% membentuk koloni putih terdapat zona bening di sekitar koloni. Dengan pengecatan Gram sel berbentuk batang dan bersifat gram positif, setelah dilakukan uji katalase memberikan hasil negatif yaitu tidak terbentuk buih setelah di tetesi hydrogen peroksida 3% atau tidak mempunyai enzim katalase. Hal ini sesuai dengan karakteristik dari bakteri asam laktat Purwandhani dan Rahayu (2003)

Tabel 2. Hasil ketahanan pH isolat bakteri asam laktat ASI

Isolat	A.1				A.2				A.3				B.1				B.2				B.3			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1.5							+																	
2.0				+			+																	
2.5				+																				
3.0									+				+				+				+			
3.5				+			+				+				+				+					+

4.0		+	+	+		+
4.5			+	+	+	+
5.0			+	+	+	+
5.5	+		+	+	+	+
6.0		+	+	+	+	+

Tabel 2. Menunjukkan uji ketahanan terhadap pH, pH rendah merupakan salah satu sifat yang penting dalam menentukan karakteristik dari probiotik. Isolat A.1 dan A.2 mampu tumbuh pada pH 1.5- 2,5 setelah diinkubasi 4 hari, hal ini karena bakteri asam laktat memiliki enzim protease yaitu aminopeptidase yang mampu mempengaruhi adaptasi dan pertumbuhan bakteri asam laktat( De angelis *et al*, 2001).Pengujian pada pH 6 atau mendekati netral dilakukan karena bakteri asam laktat juga tumbuh baik pada usus.

Tabel 3. Hasil ketahanan empedu isolat bakteri asam laktat ASI

Isolat	A.1				A.2				A.3				B.1				B.2				B.3			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E 1			+				+		+				+				+							
E 2			+				+		+				+				+			+				
E 3			+				+						+				+							+
E 4			+				+		+				+				+							
E 5		+					+		+				+				+							+

Tabel 3 menunjukkan hasil ketahanan bakteri asam laktat terhadap empedu yaitu pada isolat A.2 mampu bertahan pada kadar empedu 5% selama 4 hari inkubasi. Hal ini karena bakteri asam laktat mempunyai enzim *bile salt hydrolase* yang dapat menghidrolisa garam empedu sehingga tidak bersifat racun terhadap bakteri asam laktat ( Smet *et al*, 1995 ). Menurut Jacobsen *et al* ( 1999 ) bahwa toleransi bakteri asam laktat terhadap garam empedu pada konsentrasi 0,3% merupakan konsentrasi

kritis untuk menyeleksi isolat yang resisten terhadap garam empedu. Konsentrasi 0,3% terdapat pada bagian atas usus halus ( jejunum ) karena jejunum dekat dengan kantung empedu. Dengan demikian semua isolat bakteri asam laktat ASI berpotensi sebagai probiotik.

## **SIMPULAN**

Hasil seleksi dan isolasi bakteri asam laktat asal air susu ibu berdasarkan karakteristik menggunakan media MRS agar CaCO<sub>3</sub> 1% , morfologi sel dan fisiologis dapat ditemukan 6 isolat bakteri asam laktat dari genus *Lactobacillus*.

Berdasarkan uji ketahanan terhadap pH lambung dan garam empedu 1-5% di dapatkan 2 isolat yang tahan terhadap pH rendah dan garam empedu yaitu A.1 dan A.2 sebagai kandidat probiotik sistem kekebalan.

## **UCAPAN TERIMAKASIH**

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah memberikan dana untuk penelitian Hibah Bersaing tahun anggaran 2011 dan 2012

## **DAFTAR PUSTAKA**

- De Angelis, M., A. Corsetti, N. Tosti, J. Rossi, M. R. Corbo, and M. Gobbetti. 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2011-2020
- Djide M.N, Wahyudin E. 2008. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Air Susu Ibu, dan Potensinya dalam penurunan kadar kolesterol secara *in vitro*. *Majalah Farmasi dan Farmakologi* Vol. 12, No. 3- Nopember 2008 (ISSN:1410-7031)
- Evanikastris, 2003. Isolat dan karakteristik bakteri asam laktat dari sampel klinik yang berpotensi sebagai probiotik. Tesis. Institut Pertanian Bogor: Program Studi Ilmu Pangan
- Jacobsen, C.N., V.R.Nielsen, A.E. Hayford, P.I., Moller, K>F. Michaelsen, A.P. Erregard, B. Sandstrom, M. Tvede. And M. Jacobsen. 1999. Screening of probiotic activities of forty seven strains of *Lactobacillus.spp*.by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in human. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4949-4956
- Kusumawati, N. 2002. Seleksi bakteri asam laktat indigenous sebagai galur probiotik dengan kemampuan mempertahankan keseimbangan mikroflora usus feces dan mereduksi kolesterol serum darah tikus. Tesis. Institut Pertanian Bogor: Program Studi Ilmu Pangan
- Prangdimurti E. 2001. Probiotik dan Efek Perlindungannya Terhadap Kanker Kolon. *Makalah Falsafah Sains*. Institut Pertanian Bogor.
- Purwandhani, S.N. dan Rahayu, E S. 2003. Isolasi dan Seleksi *Lactobacillus* yang berpotensi sebagai agensia probiotik. *Agritech*; 23(2):67-74
- Smet, L.D., L.van Hoorde, M.V. Woestyne, H. Christiaens and W. Verstraete. 1995. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 292-301