

SKRINING POTENSI PROBIOTIK DAN SITOTOKSIK BAKTERI *Weisella confusa* ISOLAT DANGKE SAPI

Nana Juniarti Natsir Djide¹, Rangga Meidianto Asri
Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

ABSTRAK

Kasus kanker kolorektal mengalami peningkatan setiap tahunnya di seluruh dunia. Salah satu upaya pencegahan kanker kolorektal ialah melalui konsumsi probiotik. *Weisella confusa* tergolong dalam kelompok bakteri asam laktat, isolasi bakteri ini dangke merupakan hal yang baru dan aktivitas probiotik dari isolat ini belum diketahui. Penelitian ini bertujuan menguji sifat probiotik *W. confusa* isolat dangke dan potensi sitotoksiknya terhadap larva udang *Artemia salina* sebagai skrining awal efek antikanker. Metode pengujian sifat probiotik meliputi uji toleransi terhadap pH rendah dan uji toleransi terhadap garam empedu. Skrining efek sitotoksik dilakukan menggunakan metode *BSLT (Brine Shrimp Lethality Test)* menggunakan hasil fermentasi 72 jam dari isolat. Berdasarkan hasil pengujian, *W. confusa* isolat dangke menunjukkan sifat toleran terhadap pH 2 dan garam empedu 0,3%. Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa filtrat hasil fermentasi memiliki nilai LC50 lebih dari 1000 bpj yang menandakan sampel tidak berefek sitotoksik. Disimpulkan bahwa bakteri *W. confusa* isolat dangke menunjukkan potensi sebagai probiotik namun tidak bersifat sitotoksik sehingga tidak berpotensi untuk dilanjutkan pada uji antiproliferasi terhadap sel kanker. Pengujian aktivitas biologis lainnya disarankan untuk mengetahui potensi lain dari bakteri ini.

Kata Kunci :

Weisella confusa,
probiotik, dangke,
BSLT, *Artemia salina*

PENDAHULUAN

Setiap tahunnya, kasus kanker kolorektal mengalami peningkatan di Indonesia (1). Pola makan yang kurang baik memberikan kontribusi besar dalam memicu kanker ini (2). Konsumsi probiotik merupakan salah satu alternatif dalam pencegahan kanker kolorektal. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa probiotik memiliki peran penting dalam menunda karsinogenesis pada sel kolon melalui berbagai mekanisme. Probiotik bahkan telah digunakan sebagai tambahan dalam terapi pre- dan post-operasi kanker kolorektal dan menunjukkan hasil yang positif (3).

Bakteri asam laktat merupakan kandidat utama probiotik karena memiliki keunggulan berupa telah tergolong dalam kategori *GRAS (Generically Recognized as Safe)* (4). Penemuan strain probiotik baru merupakan hal yang penting karena setiap strain memiliki potensi probiotik yang berbeda, meskipun spesiesnya sama. Perbedaan pada karakteristik probiotik dapat terjadi pada area melekat, efek imunologis maupun terdapat perbedaan mekanisme kerja (5,6).

Dangke merupakan salah satu sumber yang memiliki potensi sebagai sumber isolat probiotik. Djide dkk. (7) berhasil mengisolasi bakteri *Weisella confusa* untuk pertama kali dari dangke sapi. Bakteri ini tergolong dalam kelompok bakteri asam laktat dengan susu sapi sebagai habitatnya.

Dalam skrining efek antikanker, *BSLT (Brine Shrimp Lethality Test)* dapat digunakan untuk toksisitas suatu senyawa terhadap larva udang

Artemia salina yang mengindikasikan sifat sitotoksik dari suatu senyawa. Rajabi *et al.* (8) mengemukakan bahwa hasil *BSLT* tidak menunjukkan perbedaan secara signifikan dengan hasil uji *MTT* dan dapat digunakan sebagai alternatif untuk uji sitotoksik

Melihat potensi isolat ini untuk dikembangkan, maka penelitian ini bertujuan untuk menguji sifat probiotik *W. confusa* isolat dangke dan potensi sitotoksiknya terhadap larva udang *A. salina* sebagai skrining awal efek antikanker.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, *autoklaf*, *centrifuge (MPW-260R®)*, inkubator aerob, jarum inokulasi, lemari pendingin, mikropipet 0,5-10µl; 10-100 µl; 20-100 µl), rak tabung *Eppendorf*, tabung *Eppendorf*, tabung reaksi, timbangan analitik (*Ohaus®*), tip filter, *spectronic-20 (Thermo-scientific®)*, spoit (*OneMed®*), vial, *vortex shaker*.

Bahan-bahan yang digunakan adalah biakan *Weisella confusa* isolat dangke (koleksi peneliti), air laut buatan, air suling, alkohol 70%, aluminium foil, *bile salt*, kapas, larutan HCl 5 N, larutan NaCl fisiologis, larva udang *Artemia salina* Leach (koleksi Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin), media *de Man Rogosa & Sharpe (MRS) Broth (Oxoid®)*.

Masuk 22-05-2019

Revisi 10-11-2019

Diterima 19-11-2019

Korespondensi

Nana Juniarti N. Djide
nanajuniartiunhas@gmail.com

Copyright

© 2019 Majalah Farmasi
Farmakologi Fakultas
Farmasi · Makassar

Diterbitkan tanggal
19-11-2019

Dapat Diakses Daring
Pada:

<http://journal.unhas.ac.id/index.php/mff>



Prosedur Kerja

Uji Sifat Probiotik

Prosedur pengujian sifat probiotik dilakukan mengikuti Sujaya et al. (9) dengan modifikasi. Biakan *W. confusa* diinkubasi dalam media MRS broth selama 48 jam pada suhu 37°C dalam kondisi aerob. Sebanyak 1 ml media kemudian dipipet dalam tabung Eppendorf dan diendapkan menggunakan *centrifuge* pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Filtrat dibuang dan endapan dicuci menggunakan 500 µl larutan NaCl 0,9%. Sebanyak 50 µl suspensi sel dipipet ke dalam masing-masing tabung Eppendorf yang telah berisi 1000 µl media MRS broth yang telah diatur keasamannya menjadi pH 2 untuk uji toleransi terhadap pH rendah dan tabung Eppendorf yang berisi MRS broth yang ditambahkan *bile salt* 0,3% untuk uji toleransi terhadap garam empedu. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 2,5 jam. Sebanyak 100 µl suspensi sel dipipet dan diencerkan 10 kalinya dengan larutan NaCl 0,9%. Hasil pengenceran dipipet sebanyak 50 µl dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi berisi 5 ml MRS broth pH netral kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Optical density media diukur pada panjang gelombang 660 nm menggunakan spectronic-20. Nilai OD₆₆₀ ≥ 0,01 menunjukkan biakan tahan terhadap kondisi pH rendah maupun terhadap garam empedu.

Uji Brine Shrimp Lethality

Biakan *W. confusa* isolat dangke ditumbuhkan dalam MRS broth selama 72 jam pada suhu 37°C kemudian Setelah 72 jam, biakan diendapkan menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Media kultur kemudian disaring menggunakan *filter syringe* 0,2 µm (Merck®). Larva udang berasal dari koleksi Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Larva udang dibiakkan dalam wadah persegi berisi air laut buatan. Wadah dibagi menjadi dua bagian dengan memasang sekat berlubang dan salah satu sisinya ditutup dengan aluminium foil. Sebanyak 50 mg telur udang diletakkan pada bagian yang gelap kemudian kotak disimpan di bawah penerangan lampu 25 watt dilengkapi dengan aerator selama 48 jam. Larva yang menyeberang ke daerah terang setelah 48 jam pendiaman diambil untuk digunakan dalam uji toksisitas. Sampel filtrat hasil fermentasi diencerkan menjadi tiga seri konsentrasi 1000 bpj, 100 bpj dan 10 bpj menggunakan air laut sebagai larutan pengencernya. Volume tiap pengenceran dicukupkan hingga 5 ml. Uji toksisitas dilakukan dengan memasukkan 10 ekor larva *A. salina* Leach yang berumur 48 jam ke dalam vial yang berisi pengenceran sampel dan didiamkan. Setelah 24 jam, jumlah larva yang mati dihitung, kriteria standar dalam penilaian kematian larva yaitu bila larva tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik saat observasi. Persentase mortalitas dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ kematian larva} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Grafik log konsentrasi terhadap persen mortalitas dalam satuan probit (ditentukan dengan mencocokkan persen mortalitas dengan satuan probit pada tabel probit) dibuat. Nilai LC₅₀ ditentukan berdasarkan rumus persamaan regresi linear dari grafik log konsentrasi-persen mortalitas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Salah satu syarat utama agar suatu mikroorganisme dapat dimanfaatkan sebagai probiotik ialah toleransi terhadap pH rendah dan garam empedu. Hasil pengujian sifat probiotik menunjukkan bahwa nilai OD₆₆₀ biakan *W. confusa* ialah ≥ 0,01 setelah ditumbuhkan dalam media dengan pH rendah maupun media yang mengandung *bile salt* 0,3% seperti yang

tersaji pada **Tabel 1**. Menurut penelitian Sujaya et al. (9), bila BAL menunjukkan nilai *optical density* pada panjang gelombang 660 nm ≥ 0,01 setelah ditumbuhkan pada pH rendah atau penambahan bile salt konsentrasi 0,3% maka bakteri diindikasikan mampu untuk bertahan dalam saluran cerna. Bakteri *Weisella confusa* termasuk dalam kelompok BAL, dengan susu sapi sebagai habitat alaminya (10). Keasaman yang rendah dianggap mewakili asam lambung sedangkan waktu inkubasi 2,5 jam mewakili lama transit makanan di dalam lambung. Mekanisme ketahanan BAL di dalam asam lambung dapat terjadi melalui modifikasi pembungkus sel, kemampuan memperbaiki DNA, pengaturan pompa proton dan kemampuan enzim dekarboksilase asam amino dalam mengkonsumsi ion H⁺ (11). Garam empedu umumnya dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif. Mekanisme ketahanan bakteri terhadap garam empedu kemungkinan berasal pada kemampuan bakteri dalam memproduksi enzim *bile salt* hidrolase (11). Hasil uji sifat probiotik menunjukkan bahwa isolat ini memiliki potensi sebagai probiotik.

Tabel 1. Nilai OD₆₆₀ Biakan setelah Diinkubasi pada pH Rendah dan Garam Empedu 0,3%

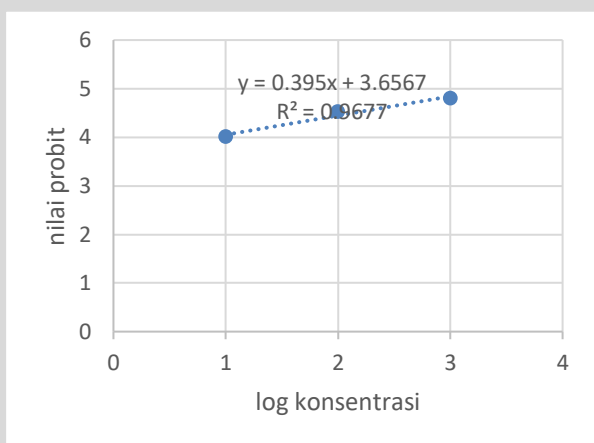
Sampel	OD 660 nm					
	pH 2			Garam Empedu 0,3%		
	1	2	3	1	2	3
<i>Weisella confusa</i> isolat dangke	1,620	1,620	1,580	1,480	1,620	1,620

Hasil uji sitotoksik disajikan pada **Tabel 1** dan **Gambar 1**. *Brine Shrimp Lethality Test* sering digunakan sebagai skrining awal efek antikanker senyawa baru karena memiliki hubungan dengan sifat sitotoksik dan anti-tumor suatu senyawa (12). Rajabi et al. (8) mengemukakan bahwa hasil BSLT tidak menunjukkan perbedaan secara signifikan dengan hasil uji MTT dan dapat digunakan sebagai alternatif untuk uji sitotoksik. BSLT memiliki keuntungan berupa biaya yang lebih rendah dan larva *A. salina* dapat tetap digunakan setelah bertahun-tahun penyimpanan dalam bentuk kering. Hasil pengujian BSLT digambarkan dalam bentuk nilai LC₅₀ yaitu konsentrasi yang dapat membunuh 50% larva udang.

Tabel 2. Hasil Nilai Absorbansi/OD dan Besar Nilai % Penghambatan (inkubasi 24 Jam)

Konsentrasi (bpj)	Larva Mati	% Mortalitas	Nilai Probit
10	8	16%	4,01
100	16	32%	4,53
1000	21	42%	4,8

Nilai LC₅₀ < 100 bpj menunjukkan aktivitas sitotoksik kuat, LC₅₀ 100-500 bpj menunjukkan aktivitas, LC₅₀ 500-1000 bpj menunjukkan aktivitas sitotoksik lemah sedangkan nilai LC₅₀ > 1000 bpj tidak menunjukkan aktivitas (8). Berdasarkan hasil pengujian, diperoleh persamaan garis dari grafik log konsentrasi terhadap nilai probit yaitu $y = 0,395x + 3,657$. Hasil perhitungan nilai LC₅₀ menunjukkan bahwa nilai LC₅₀ filtrat hasil fermentasi *W. confusa* isolat dangke sebesar 2156 µg/ml.



Gambar 1. Kurva Hubungan Log Konsentrasi dan Nilai Probit Hasil Uji BSLT Fermentat Biakan *Weisella confusa*.

Dari hasil di atas, nilai LC_{50} dari semua sampel lebih dari 1000 bpj yang mengindikasikan bahwa hasil fermentasi tidak memiliki efek sitotoksik sehingga tidak berpotensi untuk diujikan lebih lanjut pada sel kanker

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, bakteri *Weisella confusa* isolat dangke menunjukkan potensi sebagai probiotik namun tidak bersifat sitotoksik sehingga tidak berpotensi untuk dilanjutkan pada uji antiproliferasi terhadap sel kanker. Pengujian aktivitas biologis lainnya disarankan untuk mengetahui potensi lain dari bakteri ini.

adalah lebih dari 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Secara kuantitatif, nilai IC_{50} Minyak Atsiri Masoyi terhadap bakteri *Streptococcus mutans* adalah 85,047 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan IC_{90} Minyak Atsiri Masoyi

terhadap bakteri *Streptococcus mutans* adalah 491,481 $\mu\text{g}/\text{mL}$

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Hibah Internal Unhas di bawah skema Penelitian Dosen Pemula tahun 2018.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pusat Data dan Informasi. 2015. InfoDatin Stop Kanker. Jakarta: Kementerian Kesehatan
2. Kumar KS, Sastry N, Polaki H, Mishra, V. Colon Cancer Prevention through Probiotics: An Overview. *Cancer Sci Ther.* 2015;7(2): 81-92. doi:10.4172/1948-5956.1000329
3. Kahouli I, Tomaro-Duchesneau C, Prakash S. Probiotics in Colorectal Cancer (CRC) with Emphasis on Mechanism of Action and Current Perspectives. *J Med Microbiol.* 2013; 62:1107-1123. doi: 10.1099/jmm.0.048975-0
4. O'Bryan CA, Pak D, Crandall PG, Lee SO, Ricke SC. The Role of Prebiotics and Probiotics in Human Health. *J. Prob Health.* 2013;1(2): 108-116. DOI: 10.4172/2329-8901.1000108
5. Lee YK, Salminen S, editors. Handbook of Probiotics and Prebiotics. 2nd Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2009.
6. Socol CR *et al.* The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol.* 2010;48 (4): 413-434. ISSN: 1330-9682.
7. Djide NJN., Asri RM. Potensi Bakteri Probiotik dari Dangke sebagai Kandidat Penghasil Antikanker Melalui Uji Antiproliferasi Terhadap Sel Kanker Kolorektal WiDr [Laporan Penelitian]. Makassar: Universitas Hasanuddin; 2018.
8. Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M, Naji T. *Artemia salina* as a Model Organism in Toxicity Assessment of Nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2015; 23(20). DOI 10.1186/s40199-015-0105-x
9. Sujaya IN, *et al.* Potensi *Lactobacillus* spp. Isolat Susu Sumbawa sebagai Probiotik. *Jurnal Veteriner.* 2008;9(1): 33-40.
10. Fusco V, *et al.* The Genus *Weisella*: Taxonomy, Ecology and Biotechnological Potential. *Frontiers in Microbiology.* 2015; 6:155.
11. Ljungh Å, Wadström T. *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics. United Kingdom: Caister Academic Press. 2009.
12. Siddiqui R, Alam M, Amin MR, Shahid-Ud-Daula AFM, Hossain MM. Screening of Antimicrobial Potential and Brine Shrimp Lethality Bioassay of The Whole Plant Extract of *Sphalantes panicullata* Wall. ex DC. *Stamford Journal of Microbiology.* 2013;3(1): 1-5. ISSN: 2074-5346