

Potensi Isolat Bakteri Asam Laktat dari Kombucha Sebagai Antihiperkolesterol Secara *In Vitro*

In Vitro Anti Hypercholesterolemic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kombucha

Sandhika Wahyu Adhinugraha¹, I Dewa Gde Mayun Permana^{1*}, Ni Made Indri Hapsari Arihantana¹,
Ni Nyoman Puspawati¹

Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana
Kampus Bukit Jimbaran, Badung-Bali

*Penulis korespondensi: IDG Mayun Permana, E-mail: mayunpermana@unud.ac.id

Abstract

The objectives of this research were to determine the optimum incubation time of the LAB isolated from kombucha to produce the best bile salt hydrolase activity (BSH) and to better understand its in vitro cholesterol-lowering ability. The experimental design used in this research was Completely Randomized Factorial Design, with 4 isolates of LAB which were *L. pentosus* MB23; *L. pentosus* MS21; *L. paracasei ssp. paracasei* RK41; *L. plantarum* 1 RB210 and 3 levels of incubation time which were 12, 24, and 36 h were given as the treatments. The 12 combinations were obtained and were done thrice, resulting in 36 experimental units. The data obtained were analyzed using ANOVA and if it showed a significant result, the Duncan Test will be carried out. The results showed that *L. plantarum* 1 RB210 isolate exhibited its best anti hypercholesterolemic potential at 36 h of incubation with the total LAB of 8.47 log cfu/ml, BSH activity with precipitation diameter of 7.61 mm, and cholesterol-lowering ability of 62.33%.

Keywords: *lactic acid bacteria, kombucha, probiotics, bile salt hydrolase, anti hypercholesterolemic*

PENDAHULUAN

Pola makan yang tidak sehat atau tidak teratur dapat menimbulkan gangguan kesehatan yang tidak hanya terjadi pada orang dewasa saja tetapi juga anak-anak (Sartika, 2008). Salah satu permasalahan di masyarakat saat ini adalah pola makan modern yang dianut oleh sebagian masyarakat. Pola makan modern yang cenderung tidak sehat seperti mengonsumsi makanan cepat saji, yang umumnya memiliki kandungan asam lemak jenuh yang tinggi, diasosiasikan dengan peningkatan total serum kolesterol darah (Story *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2016). Meningkatnya konsumsi makanan cepat saji pada masyarakat juga dikaitkan dengan kasus obesitas, yang apabila berlangsung

selama beberapa waktu akan menyebabkan gangguan sistem metabolik yaitu berupa hiperkolesterolemia (Listiyana *et al.*, 2013). Obesitas juga menjadi salah satu faktor penyebab terjadinya beberapa penyakit kardiovaskuler seperti hipertensi, penyakit jantung koroner, dan stroke (Morgenstern *et al.*, 2009), dengan risiko hipertensi pada penderita obesitas mengalami peningkatan sebesar 2,79 kali (Rahajeng dan Tuminah, 2009).

Sebagian masyarakat mulai khawatir dan lebih menjaga pola makan sehingga mereka mulai beralih ke pangan fungsional. Menurut Manzi *et al.* (2007), pangan fungsional adalah makanan yang sudah dimodifikasi sehingga memiliki manfaat kesehatan di luar nutrisi yang dikandungnya.

Makanan atau minuman yang mengandung bakteri probiotik adalah salah satu contoh pangan fungsional. Bakteri yang digunakan sebagai probiotik berasal dari kelompok bakteri asam laktat (BAL) (Mitsuoka, 1998 dalam Iranmanesh *et al.*, 2013). Bakteri yang biasa dimanfaatkan sebagai probiotik adalah *Lactobacillus spp.* dan *Bifidobacterium spp.* (Tok dan Aslim, 2010). Bakteri asam laktat yang dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik harus memenuhi beberapa syarat yaitu bersifat non-patogen dan dapat hidup pada kondisi asam dan garam empedu tinggi, dapat tumbuh dan memiliki metabolisme yang cepat, mampu mengolonisasi dan menempel pada dinding mukosa usus, dan mampu memproduksi asam organik dan memiliki sifat antimikroba terhadap bakteri patogen. Bakteri asam laktat juga bermanfaat dalam bidang kesehatan karena dapat menurunkan kadar kolesterol. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa BAL dapat menurunkan kadar kolestesterol baik secara *in vitro* maupun *in vivo* (Usman dan Hosono, 1999; Liong dan Shah, 2005; Lye *et al.*, 2010). Kemampuan BAL dalam menurunkan kadar kolesterol karena BAL dapat mengasimilasi kolesterol dan mendeconjugasi garam empedu (Ngatirah *et al.*, 2000 dalam Winarti, 2011). Asimilasi kolesterol oleh BAL dilakukan dengan cara menyerap kolesterol ke dalam sel yang nantinya akan menyatu pada membran sel dan menyebabkan bakteri tahan terhadap lisis (Ooi dan Liong, 2010). Beberapa BAL yang sudah diketahui kemampuannya dalam mengasimilasi kolesterol adalah *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, dan *L.*

plantarum (Liong *et al.*, 2005; Lye *et al.*, 2010). Kemampuan deconjugasi garam empedu yang dimiliki BAL berkaitan dengan adanya aktivitas *bile salt hydrolase*. *Bile salt hydrolase* (BSH), atau disebut juga *choloylglycine hydrolase* (E.C.3.5.1.24) adalah enzim yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis garam empedu yang berasal dari glisin atau taurin (Tanaka *et al.*, 1999). Garam empedu hasil hidrolisis merupakan bentuk terdeconjugasi yang lebih mudah diekskresikan melalui feses (Fadhilah *et al.*, 2015). Akibat banyaknya garam empedu bebas yang terbuang bersama feses dan tidak terserap oleh usus, tubuh akan memanfaatkan kolesterol untuk menyintesis asam empedu sehingga menyebabkan kandungan kolesterol yang akan diserap ke dalam darah berkurang. Beberapa BAL yang memiliki aktivitas BSH di antaranya adalah *L. plantarum*, *L. casei*, dan *L. brevis* (Sedláčková *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2019).

Bakteri asam laktat yang berasal dari kombucha berhasil diisolasi oleh Arihantana dan Puspawati (2015). Penelitian telah dilakukan untuk menguji ketahanan isolat BAL dari kombucha terhadap pH rendah dan garam empedu sehingga diperoleh 4 isolat BAL dengan hasil terbaik yaitu *L. pentosus* MB23, *L. pentosus* MS21, *L. paracasei ssp. paracasei* RK41, dan *L. plantarum* 1 RB210 (Puspawati dan Arihantana, 2016). Aktivitas atau banyaknya BSH yang dihasilkan oleh suatu BAL dipengaruhi oleh fase pertumbuhannya dan lama waktu inkubasi. Hal ini sesuai dengan penelitian Nguyen *et al.* (2007), dimana aktivitas BSH dari *L. plantarum* PH04 pada fase stasioner lebih tinggi

dibandingkan pada fase eksponensial dan aktivitas BSH akan menurun seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Nguyen *et al.* (2007), lama waktu inkubasi yang dipilih adalah 12, 24, dan 36 jam. Hal ini juga disesuaikan dengan fase pertumbuhan BAL secara umum yang berada pada kisaran 24 sampai 48 jam. Setiap isolat BAL memiliki fase pertumbuhan dengan waktu yang berbeda dan menghasilkan aktivitas BSH yang berbeda. Isolat BAL dari kombucha belum diketahui waktu inkubasi optimalnya untuk menghasilkan BSH serta belum diketahui kemampuannya dalam menurunkan kolesterol. Oleh sebab itu, perlu dilakukan penelitian terkait optimasi waktu inkubasi BAL terhadap aktivitas BSH yang dihasilkan dan kemampuannya dalam menurunkan kolesterol.

METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 isolat BAL dari kombucha yaitu *L. pentosus* MB23; *L. pentosus* MS21; *L. paracasei ssp. paracasei* 1 RK41; dan *L. plantarum* 1 RB210 (koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pangan PS Teknologi Pangan, FTP Universitas Udayana), MRSA (Oxoid), MRSB (Oxoid), alkohol 96% (OneMed), alkohol 70% (OneMed), NaCl 0,85%, *bacteriological agar* (Oxoid), garam empedu (Merck), CaCl₂ 0,37 g/l, kit Kolesterol MR (Glory Diagnostics), kit pengecatan Gram (kristal violet, larutan lugol, aseton alkohol, pewarna safranin), larutan H₂O₂ 3%, aluminium foil, tisu, kapas, kertas saring, karet gelang, dan plastik.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *hot plate*, *ultra-low temperature freezer* (New Brunswick), *autoclave* (Hirayama), mikroskop (Nikon Eclipse E100/E100LED MV R), *vortex* (Barnstead Thermolyne Maxi Mix II), *Laminar Air Flow* (Kojair), inkubator (Mettler), *centrifuge* (Centurion Scientific), jangka sorong, spektrofotometer (Genesys 15s uv-vis), gelas objek, cawan petri (Anumbra), tabung *centrifuge* (Eppendorf), *microtube* (OneMed), labu ukur (Pyrex), gelas beaker (Pyrex), Erlenmeyer (Pyrex), neraca analitik, mikropipet 100 µl (DragonLab), mikropipet 1000 µl (DragonLab), *yellow tip* (OneMed), *blue tip* (OneMed), *white tip* (OneMed) jarum ose, *spreader*, baskom, rak tabung reaksi, penjepit tabung, dan sendok.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan dua faktor, yaitu jenis isolat BAL, yang terdiri atas 4 jenis yaitu B1 = *L. pentosus* MB23, B2 = *L. pentosus* MS21, B3 = *L. paracasei ssp. paracasei* RK41, B4 = *L. plantarum* 1 RB210, serta lama waktu inkubasi yang terdiri atas 3 taraf yaitu t1 = 12 jam, t2 = 24 jam, dan t3 = 36 jam, yang menghasilkan 12 kombinasi dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 36 unit percobaan. Data yang diperoleh dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) dan jika terdapat adanya pengaruh perlakuan akan dilanjutkan dengan Uji Duncan (Gomez dan Gomez, 1995).

Pelaksanaan Penelitian

Tahapan penelitian yang akan dilakukan meliputi penyegaran isolat BAL dari kombucha yaitu *L. pentosus* MB23, *L. pentosus* MS21, *L. paracasei* spp. *paracasei* RK41, dan *L. plantarum* 1 RB210; pembuatan kultur stok/kerja; uji konfirmasi (meliputi pengecatan Gram, pengamatan morfologi sel, dan uji katalase). Tahapan selanjutnya adalah pembiakan kultur untuk selanjutnya digunakan pada pengujian total BAL, aktivitas *bile salt hydrolase* (BSH) dengan menggunakan kertas saring yang menghasilkan zona presipitasi, dan kemampuan penurunan kolesterol dengan menggunakan spektrofotometer.

Penyegaran Isolat dan Pembuatan Kultur Stok/Kerja

Isolat BAL kombucha sebelumnya disimpan dengan menggunakan metode penjeratan (imobilisasi) (Dewanti-Hariyadi *et al.*, 2003 dalam Winarti, 2011) menggunakan manik-manik di dalam tabung *cryotube* yang berisi campuran kultur dan gliserol 20% dan disimpan pada suhu -80°C di dalam *freezer*. Sebelum digunakan, isolat harus disegarkan terlebih dahulu. Penyegaran isolat dilakukan dengan mengambil 2 sampai 4 butir manik-manik menggunakan jarum ose ke dalam tabung berisi MRSB sebanyak 4,5 ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Tumbuhnya bakteri pada MRSB terlihat dari perubahan media menjadi keruh. Isolat BAL yang sudah ditumbuhkan dalam MRSB tersebut disebar pada MRSA dengan metode *streak for single cell colony* untuk memperoleh koloni tunggal. Koloni tunggal yang sudah diperoleh

nantinya diambil dan ditumbuhkan pada MRSB kembali. Suspensi atau kultur yang sudah ditumbuhkan digunakan untuk pembuatan kultur stok dengan cara menambahkan 500 μL kultur dan 500 μL gliserol 20% dan disimpan di dalam *freezer* -80°C . Kultur kerja selanjutnya dibuat dengan cara menginokulasi isolat BAL dari kultur stok yang sudah ditumbuhkan sebelumnya pada MRSB dan disebar pada MRSA miring dalam tabung dan disimpan di dalam kulkas. Pembuatan kultur stok/kerja dilakukan setelah uji konfirmasi.

Uji Konfirmasi

Uji konfirmasi yang dilakukan meliputi pengecatan Gram, pengamatan morfologi sel, dan uji katalase.

Pengecatan Gram

Pengecatan Gram yang dilakukan merujuk pada Harrigan dan McCance (1998). Air steril diteteskan pada gelas objek dan mengoleskan 1 ose isolat kemudian difiksasi di atas bunsen. Selanjutnya, sebanyak 1 tetes pewarna kristal violet diberikan dan didiamkan selama 1 menit. Bilas dengan air dan keringkan dengan tisu. Tahap berikutnya adalah memberikan 1 tetes cairan lugol dan didiamkan selama 2 menit. Bilas dan keringkan dengan tisu. Gelas objek kemudian diteteskan dengan cairan aseton alkohol 95%, dan didiamkan selama 10 sampai 20 detik. Gelas objek kemudian dibilas dengan air dan dikeringkan dengan tisu. Terakhir, gelas objek diteteskan dengan pewarna safranin dan didiamkan selama beberapa menit. Sel bakteri atau preparat yang sudah diwarnai selanjutnya diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x. Sel bakteri yang tergolong ke dalam

kelompok Gram positif adalah sel yang memiliki warna ungu dan yang tergolong ke dalam kelompok Gram negatif adalah sel yang memiliki warna merah muda.

Pengamatan Morfologi Sel

Pengamatan morfologi bakteri yang dilakukan merujuk pada Harrigan dan McCance (1998). Preparat yang sudah diperoleh saat pengecatan Gram kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x. Bakteri yang akan digunakan untuk pengujian berikutnya adalah bakteri dengan bentuk morfologi kokus, streptokokus, basil pendek, basil yang bergandengan, dan bentuk yang menyerupai huruf Y.

Uji Katalase

Uji katalase yang dilakukan dalam penelitian ini merujuk pada Harrigan dan McCance (1998). Uji katalase dilakukan dengan mengoleskan 1 ose isolat pada kaca preparat dan diberikan 2 tetes larutan H₂O₂ 3%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas sedangkan reaksi negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gelembung gas pada preparat.

Pembiakkan Kultur

Kultur yang digunakan dalam penelitian ini adalah BAL yang telah diisolasi dari kombucha dan disimpan dalam bentuk isolat di dalam *cryotube* pada suhu -80°C. Isolat BAL kombucha ini sebelumnya sudah terlebih dahulu disegarkan pada media MRSB dan ditusukkan pada media MRSA dalam tabung yang dijadikan sebagai kultur kerja. Pembiakkan kultur dilakukan dengan cara mengambil 1 ose dari kultur kerja dan diinokulasikan ke dalam MRSB

kemudian diinkubasi dengan tiga taraf waktu berbeda yaitu 12, 24, dan 36 jam. Isolat BAL yang sudah dibiakkan kemudian digunakan untuk pengujian parameter yang akan diteliti yaitu total BAL, aktivitas BSH, dan kemampuan penurunan kolesterol.

Parameter yang Diamati

Total Bakteri Asam Laktat

Pengujian total bakteri asam laktat (BAL) merujuk pada Fardiaz (1993). Pengujian total BAL dihitung dengan cara menumbuhkan kultur yang diambil dari pengenceran 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ pada MRSA. Koloni yang dihitung dalam satu cawan petri berada pada kisaran 30 sampai 300. Setelah menghitung koloni yang tumbuh, total BAL dihitung dalam satuan cfu/ml dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Total BAL} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

Aktivitas *Bile Salt Hydrolase* (BSH)

Pengujian aktivitas *bile salt hydrolase* (BSH) dalam penelitian ini menggunakan metode *plate assay* yang merujuk pada Lim *et al.* (2004) yang dimodifikasi. Kultur yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur yang sebelumnya sudah diinkubasi dengan waktu inkubasi berbeda yaitu 12, 24, dan 36 jam. Selanjutnya, kertas saring dibasahi dengan kultur dan diletakkan pada media MRSA yang telah disuplementasi dengan 0,3% oxgall dan 0,37 g/l CaCl₂. Media MRSA yang berisi kertas saring yang telah dibasahi kultur kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Adanya aktivitas enzim BSH yang mendekongugasi garam

empedu ditandai dengan terlihatnya zona presipitasi di sekitar koloni pada media yang mengandung garam empedu dan CaCl_2 . Zona presipitasi terbentuk dari asam kolat hasil dekonjugasi garam empedu oleh BSH yang nantinya akan bereaksi dengan CaCl_2 sehingga membentuk endapan garam. Pengukuran zona presipitasi dilakukan dengan mengukur diameternya dan dicatat dalam satuan milimeter (mm).

Kemampuan Penurunan Kolesterol

Pengujian dilakukan dengan merujuk pada Fadhillah *et al.* (2015) yang dimodifikasi dan kultur yang digunakan pada pengujian kemampuan penurunan kolesterol ini adalah kultur yang sudah dibiakkan pada waktu inkubasi berbeda, yaitu 12, 24, dan 36 jam. Pengujian kemampuan penurunan kolesterol dilakukan dengan menyiapkan larutan standar kolesterol yaitu 2 mg/dl; 4 mg/dl; 6 mg/dl; 8 mg/dl; dan 10 mg/dl. Larutan baku selanjutnya ditambahkan dengan 1000 μl reagen kit CHOD-PAP kolesterol, kemudian larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah diinkubasi, dilakukan pengukuran absorbansi larutan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 510 nm.

Pengujian selanjutnya dilakukan dengan mengisi MRSB yang mengandung 0,1% kolesterol dan 0,3% oxgall ke dalam *microtube* sebanyak 112,5 μl dan kemudian diinokulasikan dengan kultur sebanyak 12,5 μl yang sudah diberikan perlakuan sebelumnya. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit untuk

memisahkan pelet atau massa sel dan supernatan. Sebanyak 50 μl supernatan diambil dan ditambahkan dengan 1000 μl reagen kit CHOD-PAP kolesterol. Selanjutnya, larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Terakhir, dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 510 nm. Untuk mengetahui kadar kolesterol dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi yang diperoleh dari larutan kurva standar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Konfirmasi

Hasil uji konfirmasi isolat BAL kombucha dapat dilihat pada Tabel 1. Uji konfirmasi terlebih dahulu dilakukan pada isolat bakteri asam laktat (BAL) yang telah diisolasi dari kombucha yaitu B1 = *L. pentosus* MB23; B2 = *L. pentosus* MS21; B3 = *L. paracasei ssp. paracasei* RK41; dan B4 = *L. plantarum* 1 RB210. Tujuan dilakukannya uji konfirmasi terhadap isolat BAL yang digunakan adalah untuk memastikan isolat yang digunakan merupakan isolat bakteri dengan karakteristik sesuai dan tidak mengalami mutasi atau kontaminasi. Berdasarkan hasil uji konfirmasi yang meliputi pengecatan Gram, pengamatan morfologi sel, dan uji katalase, keempat isolat tersebut bersifat Gram positif, katalase negatif, dan berbentuk batang. Sebelumnya, Puspawati dan Arihantana (2016) juga telah melakukan uji konfirmasi dan diperoleh hasil bahwa keempat isolat BAL yang diisolasi dari kombucha tersebut bersifat Gram positif, katalase negatif, dan berbentuk batang.

Tabel 1. Hasil uji konfirmasi isolat kombucha

No.	Jenis Isolat	Karakteristik yang diamati		
		Cat Gram	Morfologi	Katalase
1.	MB23	Positif	Batang	Negatif
2.	MS21	Positif	Batang	Negatif
3.	RK41	Positif	Batang	Negatif
4.	RB210	Positif	Batang	Negatif

Axelsson (2004) menyatakan bahwa bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok bakteri yang memiliki sifat Gram positif, berbentuk basil atau kokus, dan tidak berspora. Selain itu, Aguirre dan Collins (1993) juga menyatakan bahwa BAL memiliki sifat asidofilik, katalase negatif, tidak memiliki sitokrom, dan hidup dalam kondisi anaerob.

Menurut Salminen *et al.* (2004), BAL biasanya memiliki bentuk basil atau kokus. Selain itu, adanya perbedaan struktur dinding sel pada bakteri juga mempengaruhi hasil pengecatan Gram. Bakteri asam laktat (BAL) bersifat Gram positif, dimana setelah dilakukan pengecatan Gram akan menunjukkan warna ungu ketika diamati menggunakan mikroskop. Hal ini disebabkan karena dinding sel bakteri Gram positif hampir sepenuhnya tersusun atas peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Akibat tebalnya peptidoglikan yang dimiliki oleh bakteri Gram positif, zat warna kristal violet mampu dipertahankan dan warnanya tidak memudar meskipun sudah ditambahkan larutan pemucat (Hamidah *et al.*, 2019).

Katalase adalah enzim yang berperan dalam proses penguraian H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Bakteri asam laktat memiliki sifat katalase negatif yang artinya tidak mampu menguraikan H_2O_2 . Hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung gas saat dilakukan uji katalase terhadap bakteri asam laktat. H_2O_2 yang merupakan hasil metabolisme pada makhluk hidup biasanya diuraikan dengan bantuan katalase tetapi akan menghasilkan O_2 yang sifatnya beracun. Bakteri asam laktat adalah bakteri yang bersifat anaerob fakultatif yang memanfaatkan peroksidase untuk menguraikan H_2O_2 menjadi H_2O dan senyawa organik sehingga tidak menghasilkan O_2 atau gelembung gas yang beracun (Garbutt, 1997).

Total Bakteri Asam Laktat (BAL)

Nilai rata-rata total BAL dari isolat kombucha dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa interaksi jenis isolat BAL dan waktu inkubasi tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap total BAL. Perlakuan yang diberikan yaitu jenis isolat BAL dan waktu inkubasi tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap total BAL.

Tabel 2. Nilai rata-rata total BAL isolat kombucha

Jenis Isolat	Waktu Inkubasi (jam)			Rata-rata
	12	24	36	
MB23	9,39 ± 0,15	8,66 ± 0,06	8,34 ± 0,56	8,88 ± 0,26a
MS21	8,84 ± 0,40	8,75 ± 0,18	8,18 ± 0,50	8,59 ± 0,36a
RK41	8,36 ± 0,45	8,61 ± 0,23	8,20 ± 0,28	8,39 ± 0,32a
RB210	8,51 ± 0,40	8,46 ± 0,35	8,43 ± 0,05	8,47 ± 0,27a
Rata-rata	8,78 ± 0,35a	8,62 ± 0,20a	8,29 ± 0,35a	

Keterangan: Huruf yang sama di belakang nilai rata-rata pada baris atau kolom menunjukkan perlakuan berbeda tidak nyata ($P>0,05$)

Berdasarkan Tabel 2, nilai rata-rata total BAL dari isolat kombucha berkisar antara 8,39 – 8,88 log cfu/ml. Setiap mikroorganisme memerlukan waktu yang berbeda untuk fase pertumbuhannya. Waktu yang berbeda ini diperlukan bagi masing-masing mikroorganisme untuk membelah selnya dan bermultiplikasi. Dwidjoseputro (2003) menyatakan terdapat empat fase di dalam kurva pertumbuhan, yaitu fase adaptasi, fase eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian. Dari hasil yang diperoleh, total BAL dari keempat isolat BAL dari kombucha tidak mengalami perbedaan yang signifikan pada waktu inkubasi 12, 24, dan 36 jam. Hal ini kemungkinan disebabkan karena keempat isolat kombucha pada inkubasi jam ke-12 sudah mulai memasuki fase stasioner. Hal ini juga dapat dilihat dari tidak adanya perbedaan pada siklus log yang dimiliki masing-masing isolat. Isolat BAL kombucha memiliki kesamaan seperti penelitian yang dilakukan oleh Mardalena (2016) terkait pertumbuhan BAL yang diisolasi dari tempoyak, dimana BAL tersebut mulai memasuki fase stasionernya yaitu pada jam ke-8.

Fase stasioner adalah fase dimana jumlah sel mikroorganisme yang tumbuh seimbang atau sama dengan jumlah sel mikroorganisme yang mati. Fase stasioner ini masih berlangsung pada jam ke-24 dan sampai pada jam ke-36. Jika dibandingkan pada waktu inkubasi jam ke-12 dan 24, jumlah populasi BAL mengalami penurunan pada waktu inkubasi jam ke-36 walaupun tidak terlalu signifikan. Hal ini dapat menandakan bahwa keempat isolat kombucha diduga baru memasuki fase kematian setelah inkubasi 36 jam. Fase kematian umumnya berjalan dengan laju yang sama seperti laju pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial. Fase kematian terjadi akibat menurunnya kandungan nutrisi pada media pertumbuhan dan adanya penumpukan hasil metabolit yang bersifat toksik (Cappuccino dan Sherman, 2011).

Aktivitas *Bile Salt Hydrolase* (BSH)

Nilai rata-rata aktivitas *bile salt hydrolase* (BSH) dari isolat kombucha dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai rata-rata aktivitas BSH dari isolat kombucha

Jenis Isolat	Waktu Inkubasi (jam)			Rata-rata
	12	24	36	
MB23	7,72 ± 0,05	8,03 ± 0,77	7,86 ± 0,56	7,87 ± 0,45b
MS21	8,30 ± 0,65	9,11 ± 0,71	8,39 ± 0,35	8,06 ± 0,56a
RK41	8,19 ± 0,60	8,01 ± 0,14	7,72 ± 0,46	7,98 ± 0,40b
RB210	8,07 ± 0,38	8,24 ± 0,21	7,61 ± 0,62	7,97 ± 0,40b
Rata-rata	8,07 ± 0,42a	8,35 ± 0,46a	7,90 ± 0,50a	

Keterangan: Huruf yang sama di belakang nilai rata-rata pada baris atau kolom yang sama menunjukkan perlakuan berbeda tidak nyata ($P>0,05$)

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa interaksi jenis isolat BAL dan waktu inkubasi tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap aktivitas *bile salt hydrolase* (BSH). Perlakuan yang diberikan yaitu jenis isolat BAL berpengaruh nyata ($P<0,05$) dan waktu inkubasi tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap aktivitas BSH. Berdasarkan Tabel 3, keempat isolat kombucha menunjukkan adanya aktivitas BSH dengan rata-rata aktivitas BSH berkisar antara 7,87 – 8,06 mm, dimana isolat *L. pentosus* MS21 menunjukkan aktivitas BSH terbaik, dengan nilai rata-rata aktivitas BSH sebesar 8,06 mm dan berbeda nyata dengan ketiga isolat lainnya. Adanya aktivitas BSH yang terlihat dari keempat isolat kombucha tersebut sesuai dengan pernyataan Tanaka *et al.* (1999) yang menyatakan bahwa tidak menutup kemungkinan bahwa BAL yang diisolasi selain dari saluran pencernaan mampu menghasilkan BSH. Salah satu mekanisme yang dilakukan oleh BAL untuk menurunkan kolesterol adalah dengan memproduksi *bile salt hydrolase* (BSH). *Bile salt hydrolase* (BSH) digunakan oleh BAL untuk mendekongugasi garam empedu menjadi bentuk

terdekonjugasinya yaitu garam empedu bebas. Garam empedu yang sudah terdekonjugasi (garam empedu bebas) memiliki sifat yang lebih mudah untuk diekskresikan bersama feses (Puryana, 2011). Akibat banyaknya garam empedu bebas yang terbangun bersama feses dan tidak terserap oleh usus, tubuh akan memanfaatkan kolesterol untuk menyintesis asam empedu sehingga menyebabkan kandungan kolesterol yang akan diserap ke dalam darah berkurang.

Berdasarkan nilai rata-rata total BAL yang diperoleh dari keempat isolat kombucha, keempat isolat kombucha diduga sudah memasuki fase stasioner pada waktu inkubasi jam ke-12 sampai ke-36 yang terlihat dari perbedaan yang tidak terlalu signifikan. Penelitian yang dilakukan oleh Nguyen *et al.* (2007) menunjukkan bahwa aktivitas BSH yang dimiliki oleh *L. plantarum* PH04 baru terdeteksi pada fase stasionernya. Hal ini juga sesuai dengan keadaan dimana bakteri yang masuk dan melewati usus halus memiliki kondisi fisiologis yang sama pada saat fase stasioner serta berdasarkan hasil penelitian tersebut juga dikatakan bahwa aktivitas BSH pada fase

stasioner juga cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan fase eksponensialnya.

BSH yang diproduksi oleh BAL juga berkaitan dengan mekanisme pertahanannya dalam saluran pencernaan, karena enzim tersebut berfungsi untuk menghidrolisis garam empedu (Sedláčková *et al.* 2015). BSH membantu untuk mengurangi atau mendetoksifikasi sifat toksik dari garam empedu yang dapat mengganggu pertumbuhan BAL (Begley *et al.*, 2006). Perbedaan hasil pengujian aktivitas BSH dapat disebabkan karena adanya perbedaan kemampuan setiap jenis isolat BAL dalam

memproduksi BSH atau aktivitas BSH yang dimiliki oleh BAL bergantung pada *strain* atau spesiesnya. Hal ini sejalan dengan penelitian yang sudah dilakukan dimana *strain* yang diisolasi dari makanan mampu memiliki kemampuan yang sama, atau bahkan lebih baik dari *strain* yang diisolasi dari manusia atau feses mamalia (Hernández-Gómez *et al.*, 2021).

Kemampuan Penurunan Kolesterol

Nilai rata-rata persentase kemampuan penurunan kolesterol dari isolat kombucha dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai rata-rata persentase kemampuan penurunan kolesterol dari isolat kombucha

Jenis Isolat	Waktu Inkubasi (jam)		
	12	24	36
MB23	29,00 ± 0,10b b	53,33 ± 0,12a a	40,00 ± 0,03ab b
MS21	50,00 ± 0,34a a	31,00 ± 0,04a b	58,00 ± 0,14a a
RK41	27,00 ± 0,19a b	27,67 ± 0,05a b	30,33 ± 0,07a b
RB210	54,33 ± 0,07a a	54,67 ± 0,07a a	62,33 ± 0,01a a

Keterangan: Huruf yang sama di belakang nilai rata-rata pada baris atau kolom yang sama menunjukkan interaksi perlakuan berbeda tidak nyata ($P > 0,05$)

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa interaksi antara jenis isolat BAL dan waktu inkubasi berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap kemampuan penurunan kolesterol serta salah satu perlakuan yaitu jenis isolat berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap kemampuan penurunan kolesterol. Berdasarkan Tabel 4, nilai rata-rata persentase penurunan kolesterol yang dilakukan pada isolat kombucha

dengan waktu inkubasi berbeda berkisar antara 27,00 – 62,33%. Persentase kemampuan penurunan kolesterol tertinggi diperoleh pada isolat *L. plantarum* 1 RB210 pada waktu inkubasi 36 jam, yaitu sebesar 62,33%, dan berbeda tidak nyata dengan isolat *L. plantarum* 1 RB210 pada waktu inkubasi 12 dan 24 jam, isolat *L. pentosus* MS21

pada waktu inkubasi 12 dan 36 jam, serta isolat *L. pentosus* MB23 pada waktu inkubasi 24 jam.

Bakteri asam laktat diduga memiliki kemampuan dalam menurunkan kolesterol. Selain melalui produksi enzim yang disebut *bile salt hydrolase*, BAL juga dapat menurunkan kolesterol melalui proses asimilasi. Asimilasi yang dimaksud adalah kemampuan BAL untuk menyerap kolesterol, yang nantinya kolesterol tersebut akan menyatu dengan membran sel bakteri dan menyebabkan bakteri tersebut menjadi tahan terhadap lisis (Ooi dan Liang, 2010). Pengujian kemampuan menurunkan kolesterol melalui proses asimilasi dilakukan pada keempat isolat kombucha dengan merujuk pada Fadhillah *et al.* (2015) yang dimodifikasi. Kemampuan BAL dalam menurunkan kolesterol melalui proses asimilasi dapat dilihat dari adanya penurunan jumlah kolesterol pada media pertumbuhan.

Hasil penelitian menunjukkan keempat isolat BAL dari kombucha memiliki potensi sebagai antihiperkolesterol dengan kemampuan penurunan kolesterol yang berbeda-beda. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan dari hasil pengujian aktivitas BSH, dimana terdapat isolat BAL yang memiliki aktivitas BSH yang tinggi tetapi tidak dengan kemampuan penurunan kolesterol ataupun sebaliknya. Meskipun tingginya aktivitas BSH dianggap akan memiliki kemampuan yang tinggi dalam menurunkan atau mengasimilasi kolesterol, tetapi kedua hal tersebut tidak selalu beriringan. Hal ini disebabkan kemungkinan adanya perbedaan mekanisme yang dilakukan oleh BAL (Julendra *et*

al., 2017). Perbedaan kemampuan BAL dalam mengasimilasi kolesterol yang diperoleh kemungkinan juga tergantung dari setiap *strain* (*strain dependent*) (Winarti, 2011). Hal ini juga berkaitan dengan komposisi kimia dan struktur dari peptidoglikan pada dinding sel yang dimiliki setiap *strain* yang mengandung asam amino sehingga mampu mengasimilasi atau mengikat kolesterol (Kimoto-Nira *et al.*, 2007).

KESIMPULAN

Interaksi jenis isolat BAL dan waktu inkubasi berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap kemampuan penurunan kolesterol. Jenis isolat berpengaruh nyata terhadap aktivitas BSH dan kemampuan penurunan kolesterol.

Keempat isolat BAL kombucha dapat menurunkan kolesterol, dimana isolat *L. plantarum* 1 RB210 memiliki kemampuan sebagai antihiperkolesterol terbaik pada waktu inkubasi 36 jam dengan total BAL sebesar 8,47 log cfu/ml, aktivitas BSH dengan zona presipitasi sebesar 7,61 mm, dan kemampuan penurunan kolesterol sebesar 62,33%.

DAFTAR PUSTAKA

- Aguirre, M. dan M. D. Collins. 1993. A review: lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology*. 75(2): 95–107.
- Arihantana, N. M. I. H. dan N. N. Puspawati. 2015. Potensi BAL Kandidat Probiotik yang Diisolasi dari Minuman Fungsional Teh Kombucha. Laporan Hasil Penelitian Hibah

Unggulan Program Studi. Tidak dipublikasikan. Universitas Udayana.

- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria. S. Salminen, A. von Wright, and A. Ouwehand (Eds.). 3rd ed. Marcel Dekker, Inc.
- Begley, M., C. Hill, dan C. G. M. Gahan. 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(3): 1729–1738.
- Cappuccino, J. G. dan N. Sherman. 2011. *Microbiology: A Laboratory Manual*. 9th ed. Pearson Education, Boston.
- Dwidjoseputro. P. D. 2003. Di dalam *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan, Jakarta.
- Fadhilah, A. N., Hafsan. dan F. Nur. 2015. Penurunan Kadar Kolesterol Oleh Bakteri Asam Laktat Asal Dangke Secara In Vitro. *Prosiding Seminar Nasional Mikrobiologi Kesehatan dan Lingkungan*. Makassar. 175–180.
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Garbutt, J. 1997. *Essentials of Food Microbiology*. Hodder Arnold Publishers, London.
- Gomez, K. A. dan A. A. Gomez. 1995. *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian*. UI Press, Jakarta.
- Hamidah, M. N., L. Rianingsih, dan Romadhon. 2019. Aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat dari peda dengan jenis ikan berbeda terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*. 1(2): 11–21.
- Iranmanesh, M., H. Ezzatpanah, dan N. Mojgani. 2013. Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products. *LWT - Food Science and Technology*. 1–5.
- Julendra, H., A. E. Suryani, L. Istiqomah, E. Damayanti, M. Anwar, dan N. Fitriani. 2017. Isolation of lactic acid bacteria with cholesterol lowering activity from digestive tracts of Indonesian native chickens. *Media Peternakan*. 40(1): 35–41.
- Kimoto-Nira, H., K. Mizumachi, M. Nomura, M. Kobayashi, Y. Fujita, T. Okamoto, I. Suzuki, N. M. Tsuji, J. Kurisaki, dan S. Ohmomo. 2007. *Lactococcus* sp. as potential probiotic lactic acid bacteria. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 41(3): 181–189.
- Lim, H. J., S. Y. Kim, dan W. K. Lee. 2004. Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *Journal of Veterinary Science*. 5(4): 391–395.
- Liong, M. T. dan N. P. Shah, 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science*. 88(1): 55–66.
- Listiyana, A. D., Mardiana, dan G. N. Prameswari. 2013. Obesitas sentral dan kadar kolesterol darah total. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 9(1): 37–43.
- Lye, H. S., G. Rusul, dan M. T. Liong. 2010. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *Journal of Dairy Science*. 93(4): 1383–1392.
- Ma, C., S. Zhang, J. Lu, C. Zhang, X. Pang, dan J. Lv. 2019. Screening for cholesterol-lowering probiotics from lactic acid bacteria isolated from corn silage based on three hypothesized pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(9): 2073.
- Mardalena. 2016. Fase pertumbuhan isolat bakteri asam laktat (bal) tempoyak asal Jambi yang disimpan pada suhu kamar. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*. 11(1): 58–66.
- Manzi, P., S. Marconi, dan L. Pizzoferrato. 2007. New functional milk-based products in the Italian market. *Food Chemistry*, 104(2): 808–813.
- Morgenstern, L. B., J. D. Escobar, B. N. Sánchez, R. Hughes, B. G. Zuniga, N. Garcia, dan L. D. Lisabeth. 2009. Fast food consumption and neighborhood stroke risk. *Annals of Neurology*. 66(2): 165–170.
- Nguyen, T. D. T., J. H. Kang, dan M. S. Lee. 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum*

- PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology*. 113(3): 358–361.
- Puryana, I. G. S. P. 2011. Populasi *Lactobacillus rhamnosus* SKG34 dalam saluran pencernaan dan pengaruhnya terhadap kadar kolesterol tikus putih (*Rattus norvegicus*). Tesis S2. Tidak dipublikasikan. Universitas Udayana, Denpasar.
- Puspawati, N. N. dan N. M. I. H. Arihantana. 2016. Viability of lactic acid bacteria isolated from kombucha tea against low pH and bile salt. *Media Ilmiah Teknologi Pangan*. 3(1): 18–25.
- Rahajeng, E. dan S. Tuminah. 2009. Prevalensi hipertensi dan determinannya di Indonesia. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 59(12): 580–587.
- Salminen, S., A. von Wright, dan A. Ouwehand. 2004. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Marcell Dekker, Inc., New York.
- Sartika, R. A. D. 2008. Pengaruh asam lemak jenuh, tidak jenuh dan asam lemak trans terhadap kesehatan. *Jurnal Kesehatan Masyarakat Nasional*. 2(4): 154–160.
- Sedláčková, P., Š. Horáčková, T. Shi, M. Kosová, dan M. Plocková. 2015. Two different method of screening of bile salt hydrolase activity in *Lactobacillus* strain. *Czech Journal of Food Science*. 33: 13–18.
- Story, M., D. Neumark-Sztainer, dan S. French. 2002. Individual and environmental influences on adolescent eating behaviors. *Journal of The American Dietetic Association*. 102(3): 40–51.
- Tanaka, H., K. Doesburg, T. Iwasaki, dan I. Mierau. 1999. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal of Dairy Science*. 82(12): 2530–2535.
- Tok, E. dan B. Aslim. 2010. Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotics. *Microbiology and Immunology*. 54: 257–264.
- Usman dan Hosono. 1999. Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *Journal of Dairy Science*. 82: 243–248.
- Winarti, S. 2011. Seleksi Bakteri Asam Laktat Isolat ASI yang Berpotensi Menurunkan Kolesterol secara In Vitro. Skripsi S1. Tidak dipublikasikan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Zhang, J., Z. Wang, H. Wang, W. Du, C. Su, J. Zhang, H. Jiang, X. Jia, F. Huang, F. Zhai, dan B. Zhang. 2016. Association between dietary patterns and blood lipid profiles among Chinese women. *Public Health Nutrition*. 19(18): 3361–3368.