

Karakterisasi *Lactobacillus* spp. yang Diisolasi dari Susu Kambing Etawa untuk Pengembangan Probiotik

(CHARACTERIZATION OF LACTOBACILLUS SPP., ISOLATED FROM MILK OF ETAWA GOATS FOR LOCAL PROBIOTIC DEVELOPMENT)

Putu Rima Sintyadewi¹, Yan Ramona^{1,2}, I Nengah Sujaya^{1,3*})

¹Program Studi Magister Ilmu Biologi, Program Pascasarjana, Universitas Udayana.

²UPT Laboratorium Terpadu Biosain dan Bioteknologi, Unud, Gedung AD, Komplek Fakultas Peternakan, Bukit Jimbaran, Badung, Bali.

³Program Studi Ilmu Kesehatan Masyarakat, Fakultas Kedokteran, Unud, Jl. Sudirman, Denpasar, Bali. Tel/Fax: +62 361 7448773, *E-mail: sakabali@hotmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi *Lactobacillus* spp. yang diisolasi dari susu kambing etawa untuk pengembangan probiotik lokal. Sebanyak 23 isolat *Lactobacillus* spp. diuji ketahanannya pada pH rendah (pH 2, 3, dan 4) dan natrium deoksi kolat (0,2, 0,4, dan 0,6 mM), aktivitasnya mentransformasi asam kolat (*cholic acid*) menjadi deoksi kolat (*deoxy cholic acid*), serta ketahanannya selama melalui saluran pencernaan bagian atas secara *in vitro*. Isolat yang paling berpotensi berdasarkan karakter tersebut selanjutnya diidentifikasi dengan analisis parsial 16S rDNA menggunakan primer 27F dan 520R. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebanyak 12 isolat *Lactobacillus* spp. mampu bertahan pada pH 2, 3, dan 4, dapat tumbuh pada medium mengandung 0,2-0,6 mM natrium deoksi kolat. Tiga isolat yang menunjukkan ketahanan yang baik pada pH rendah dan natrium deoksi kolat yaitu *Lactobacillus* spp. GMA46, GMA47, dan GMA50 tidak mentransformasi asam kolat menjadi asam deoksi kolat. Pada karakterisasi selanjutnya ditemukan bahwa *Lactobacillus* spp. GMA46 memiliki kemampuan paling baik pada simulasi saluran pencernaan bagian atas yang merupakan model cairan lambung dan usus pada pH 2, 3, dan 4, serta mengandung enzim pepsin dan pankreatin. Hal ini menunjukkan *Lactobacillus* spp. GMA46 dapat bertahan dalam keadaan hidup selama perjalanannya dari mulut menuju saluran pencernaan bagian bawah. Hasil identifikasi berdasarkan sekuen nukleotida parsial pada bagian variabel area 1-3 dari 16S rDNA menunjukkan bahwa *Lactobacillus* sp. GMA46 menunjukkan kesamaan tinggi (100% homolog) dengan *L. casei* ATCC 334 dan *L. paracasei subsp. tolerans strain* NBRC 15906. Simpulan penelitian ini menunjukkan bahwa *Lactobacillus* sp. GMA46 merupakan strain probiotik potensial asli Indonesia dari susu kambing etawa.

Kata-kata kunci: *Lactobacillus*, susu kambing etawa, probiotik, 16S rDNA

ABSTRACT

The objective of this research was to characterize *Lactobacillus* spp., isolated from milk of Etawa goats for local probiotic development. Total of 23 isolates *Lactobacillus* spp. were tested for resistance to low pH conditions, high levels of natrium deoxy cholate, and modified gastric juice conditions. Besides that, those isolates were also tested to convert cholic acid (CA) into deoxycholic acid (DCA). Isolate that showed the most potential properties for local probiotic development was identified by 16S rDNA analysis using following amplification of this sequence with primers of 27F and 520R). The results showed that 12 isolates were found to be resistant to low pH conditions and to high level of NaDC (0.6 mM). Three of them (*Lactobacillus* spp. GMA46, *Lactobacillus* spp. GMA47 and *Lactobacillus* spp. GMA50) did not convert cholic acid into deoxy cholic acid, indicating that they are safe for human use. *Lactobacillus* spp. GMA46 showed better performance in the gastric juice (a model of gastic and intestinal juice containing pepsin and pancreatin enzymes at pH 2, 3 and 4) simulation test. This GMA46 isolate was identified as *L. casei* ATCC 334 and *L. paracasei subsp. tolerans strain* NBRC 15906 with 100% similarity, in term of its 16s rDNA nucleotide sequence. The results of this research indicate that *Lactobacillus* sp. GMA46 is an Indonesian potential probiotic strain, isolated from milk of etawa goats

Key words : *Lactobacillus*, milk of etawa goats, probiotic, 16S rDNA

PENDAHULUAN

Kambing etawa dikenal sangat baik sebagai hewan perah dan penghasil daging (Sutama dan Budiarsana, 2000). Kesadaran masyarakat akan kesehatan semakin meningkat belakangan ini, menyebabkan animo masyarakat untuk minum susu termasuk susu kambing etawa meningkat. Susu kambing etawa di samping kandungan gizinya yang baik, diklaim memiliki efek menyehatkan dan dapat menyembuhkan berbagai penyakit seperti *bronchitis*, asma, anemia, *tuberculosis*, menurunkan kolesterol dan thalasemia (Moeljanto, 2002). Susu kambing etawa juga diketahui dapat digunakan sebagai alternatif konsumsi susu bagi penderita *lactose intolerance* menggantikan susu sapi, karena memiliki ukuran lactoglobulin yang lebih kecil dibandingkan susu sapi (Zareire *et al.*, 2006).

Beberapa peneliti telah mengisolasi bakteri asam laktat (BAL) dari genus *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* dan *Lactobacillus* dari susu kambing peranakan etawa (PE), peranakan *saanen* (PESA) serta beberapa jenis kambing yang ada di daerah Aljazair dan Janiang Malaysia (Guessas dan Kihal, 2004; Setyawardani, 2012; Rozila *et al.*, 2012). Selanjutnya, Rozila *et al.*, (2012) juga melaporkan bahwa *Lactococcus* dan *Lactobacillus* yang diisolasi dari susu kambing segar dan susu fermentasi di Selangor dan Jeniang, Malaysia mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen saluran pencernaan seperti, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Listeria monocytogene*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* V517 *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Enterobacter aerogenes*. Dari laporan tersebut ditunjukkan bahwa efek menyehatkan akibat mengkonsumsi susu kambing etawa mungkin erat kaitannya dengan kandungan bakteri asam laktat dalam susu tersebut.

Sampai saat ini, eksplorasi potensi BAL pada susu kambing etawa dalam pengembangan probiotik dan produk pangan fungsional lainnya belum banyak diteliti. Dalam pengembangan BAL sebagai probiotik, ketahanan BAL pada saluran pencernaan merupakan salah satu syarat yang harus dipenuhi oleh kelompok BAL untuk dapat memberikan efek menyehatkan pada saluran pencernaan. Sebanyak 23 isolat *Lactobacillus* spp. telah berhasil diisolasi dari susu kambing etawa penelitian ini bertujuan mengungkap lebih mendalam potensi BAL,

khususnya pada potensinya sebagai probiotik dalam bertahan pada kondisi saluran pencernaan manusia, sehingga dapat meningkatkan derajat kesehatan masyarakat Indonesia.

METODE PENELITIAN

Isolat *Lactobacillus* spp. dan Metode Pemiakannya

Isolat *Lactobacillus* spp. diisolasi dari susu kambing etawa segar yang diambil dari Kelompok Tani Werdi Gopala di Desa Pucaksari Kecamatan Busung Biu Kabupaten Buleleng, Bali. Isolat disimpan di UPT Laboratorium Biosain dan Bioteknologi, Universitas Udayana dalam gliserol 30% pada suhu -20°C. Isolat *Lactobacillus* spp. ditumbuhkan dengan cara menginokulasi sebanyak 100 µL isolat *Lactobacillus* spp. dari stok gliserol ke dalam medium *De Man Regosa Sharpe* (MRS) broth (Fluka®) dan diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C dalam suasana anaerob dengan menggunakan *anaerobic chamber* yang berisi *anaeropack* (Mitsubishi gas)

Ketahanan *Lactobacillus* spp. terhadap pH Rendah dan Natrium Deoksi Kolat (NaDC)

Ketahanan *Lactobacillus* spp. terhadap pH rendah dan natrium deoksi kolat (NaDC, SIGMA) dilakukan dengan mengadopsi metode yang diterapkan oleh Sujaya *et al.*, (2008). Pertumbuhan *Lactobacillus* spp. ditentukan dengan mengukur absorbansi suspensi sel menggunakan spektrofotometer (Genesis 20, Thermo Electron Coporation) pada panjang gelombang 660 nm (OD₆₆₀). Pertumbuhan dianggap positif apabila nilai OD₆₆₀ nm lebih besar dari 0.1 (Sujaya *et al.*, 2008)

Konversi Asam Kolat Menjadi Asam Deoksi Kolat oleh *Lactobacillus* spp.

Sebanyak 50 µL kultur *Lactobacillus* spp. disuspensikan ke dalam 5 mL MRS broth pH 8,0 yang telah ditambahkan 20 µL asam kolat (*cholic acid*, SIGMA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Kurdi *et al.*, 2000; Yoshida, 2004). Kemudian, sebanyak 1 mL kultur ini disentrifugasi selama lima menit pada kecepatan 5.000 g pada suhu 5°C, supernatannya sebanyak 0,1 mL ditampung dalam tabung *ependorf*, ditambahkan dengan 500 µL etil asetat dan 20 µL HCl, disentrifugasi selama lima menit pada kecepatan 5000 g,

supernatannya ditambahkan dengan 500 μ L etil asetat, disentrifugasi kembali selama lima menit pada kecepatan 5000 g, supernatannya dipipet dan ditransfer kedalam tabung *ependorf* yang berisi supernatan pertama. Selanjutnya, campuran tersebut diuapkan selama 48 jam pada suhu kamar, lalu ditambahkan dengan 15 μ L metanol. Selanjutnya, sebanyak 1 μ L *deoxy cholat acid* (DCA) (SIGMA), *cholic acid* (CA), dan ekstrak dari masing-masing isolat *Lactobacillus* spp. ditotolkan pada Komatografi Lapis Tipis (KLT) (*silica gel* TLC, Merck No. 1.05553), dikeringkan dengan *hairdruyer*, diletakkan pada *chamber* yang telah berisi eluen (10 mL *Cyclohexane*, 15 mL etil asetat dan 4 mL asam asetat), dikeringkan, disemprotkan dengan pewarna *molibddoposporic acid* (10% dalam etanol 99,9%) dan dioven sampai spot dari masing-masing isolat terlihat pada *silica gel* (Sujaya *et al.*, 2008). Nilai *Retention factor* (Rf) dihitung dengan cara membagi jarak yang ditempuh substansi dengan jarak yang ditempuh pelarut (Lipsy, 2010).

Ketahanan *Lactobacillus* spp. pada Model Saluran Pencernaan

Ketahanan *Lactobacillus* spp. isolat susu kambing etawa pada simulasi saluran pencernaan mengacu pada metode Fernandez *et al.*, (2003). Sebanyak 1 mL kultur *Lactobacillus* spp. disentrifugasi pada kecepatan 5.000 g selama lima menit, pelet bakteri dicuci menggunakan saline dan dikocok. Langkah tersebut diulang kembali sebanyak dua kali, sehingga diperoleh massa sel bakteri yang selanjutnya ditambahkan dengan 500 μ L saline. Sebanyak 50 μ L masa sel disuspensikan ke dalam masing-masing tabung *ependorf* yang telah berisi 1 mL larutan model *gastric juice* (7 mM KCl, 45 mM NaHCO₃ dan 125 mM NaCl) dengan pH 2, 3, atau 4 dan ditambahkan dengan 7,5 μ L enzim pepsin 0,1%, diinkubasi pada suhu kamar dengan *dishaker* selama 1,5 jam dengan kecepatan 120 g. Suspensi dipipet sebanyak 100 μ L untuk diencerkan tiga tujuh kali dan disebar pada permukaan media MRS agar (Oxoid) (untuk tingkat pengenceran 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵), diinkubasi dalam keadaan anaerob menggunakan *anaeropack* (Mitsubishi gas) selama 48 jam pada suhu 37°C. Selain itu, sebanyak 50 μ L suspensi tersebut juga diinokulasi ke dalam 5 mL MRS *broth* dan diinkubasi selama 24 jam untuk diukur pertumbuhannya dengan menggunakan

spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm (OD₆₆₀ nm).

Sisa suspensi tersebut kembali diinkubasi pada *shaker* selama tiga jam pada kecepatan 120 g, selanjutnya dilakukan hal yang sama seperti tersebut. Sebanyak 800 μ L suspensi dari sampel awal disentrifugasi pada kecepatan 5.000 g selama lima menit, pelet bakteri yang diperoleh dicuci menggunakan larutan saline dan dihomogenkan. Langkah tersebut diulang kembali sebanyak dua kali. Selanjutnya, dari suspensi tersebut dipipet sebanyak 50 μ L, ditambahkan dengan 1 mL larutan cairan lambung pH 8, 7,5 μ L enzim pancreatin 0,1% dan 0,2 mM NaDC untuk selanjutnya diinkubasi selama empat jam pada suhu kamar dengan digoyang pada kecepatan 120 g. Setelah empat jam suspensi dinokulasi ke dalam 5 mL MRS *broth* serta sebagian disebar pada MRS agar untuk menghitung jumlah sel yang bertahan hidup. Untuk sel yang diinokulasi ke dalam MRS *broth* pertumbuhan *Lactobacillus* spp. diukur pada nilai OD₆₆₀ nm.

Identifikasi *Lactobacillus* spp. Isolat Susu Kambing Etawa

Total DNA genom *Lactobacillus* spp. potensial diisolasi dengan menggunakan *Kit Nucleo Spin Tissue*. Sebanyak 1 mL suspensi *Lactobacillus* spp. dimasukkan ke dalam tabung tabung *ependorf*, disentrifugasi selama lima menit pada kecepatan 7000 g pada suhu 10°C, peletnya dicuci dengan 200 μ L air steril, dihomogenkan, dan disentrifugasi kembali selama lima menit pada kecepatan 7000 g dengan suhu 10°C (prosedur pencucian sel dilakukan sebanyak dua kali). Massa sel yang diperoleh ditambahkan dengan 180 μ L T-1 dan 25 μ L Proteinase K, dihomogenkan, diinkubasi selama dua jam pada suhu 56°C dalam penangas air, ditambahkan 200 μ L *Lyse Buffer* (B3), dikocok, diinkubasi kembali selama 10 menit pada suhu 70°C dalam penangas air, ditambahkan dengan 210 μ L Etanol 99%, dihomogenkan dan ditransfer ke dalam *Kit Nucleo Spin Tissue Coloumn* di dalam *collection tube*. Suspensi disentrifugasi selama satu menit pada kecepatan 11.000 g pada suhu 5°C, supernatannya dibuang dan peletnya ditambahkan dengan 500 μ L *Wash Buffer* (BW), disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 11.000 g dengan suhu 5°C, pelet ditambahkan 600 μ L *Buffer* (B5), disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 11.000 g pada suhu 5°C dan supernatannya dibuang. *Nucleo Spin Tissue*

Column dipindahkan ke tabung *tabung eppendorf* baru, ditambahkan 100 μ L *Elution Buffer* (BE) (sebelumnya BE dipanaskan pada suhu 70°C), disentrifugasi selama satu menit pada kecepatan 11.000 g pada suhu 5°C dan DNA siap digunakan. Sisa DNA yang tidak terpakai disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C (Nucleo Spin®Tissue, 2010)

Amplifikasi dan Pembacaan Urutan Basa Nukleotida Gen 16S rDNA *Lactobacillus* spp. Isolat Susu Kambing Etawa

DNA *Lactobacillus* spp. dilakukan dengan PCR sesuai dengan metode Sambrook dan Russel (2001) yang telah dimodifikasi. Amplifikasi dilakukan menggunakan sepasang primer, yaitu 27-F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') dan 520-R (5' ACC GCG GCK GCT GGC 3'). Total volume campuran reaksi PCR adalah 50 μ L dengan komposisi 48 μ L PCR *master mix* dan 2 μ L DNA *Lactobacillus* spp. PCR *master mix* terdiri dari 5 μ L dNTPs 2mM (Applied Biosystems), 5 μ L PCR buffer 10X (Applied Biosystems), 3,5 μ L MgCl₂ 25 mM (Applied Biosystems), 1 μ L primer 27F 10 pmol, 1 μ L primer 520R 10 pmol (Promega), 0,25 μ L *taq polymerase* (Invitrogen) dan 34,25 μ L *deionize water*.

Amplifikasi PCR dilakukan dalam *Infinigen thermocycler* TC-25/H pada suhu *predenaturasi* 94°C selama lima menit, dilanjutkan dengan 30 siklus PCR yang meliputi, *denaturasi* 94°C selama 30 detik, *annealing* 55°C selama 30 detik, *elongation* 72°C selama dua menit dan *final elongation* 72°C selama lima menit. Produk PCR selanjutnya dielektroforesis pada agarosa 1,2% dan divisualisasikan pada UV transluminator. Pembacaan urutan basa nukleotida dari gen 16S rDNA dilakukan di 1stBase Malaysia. Produk PCR tersebut dimurnikan dan pembacaan urutan basa nukleotida dari gen 16S rDNA dilakukan dengan menggunakan metode *Big Dye terminator sequencing* dalam mesin *Automated Capillary Sequencer* (Peter *et al.*, 2004).

Analisis Urutan Basa Nukleotida Gen 16S rDNA *Lactobacillus* spp. Isolat Susu Kambing Etawa

Data susunan nukleotida yang diperoleh dibaca menggunakan *software* DNA *sequencer* versi 1 (Applied biosystems). Analisis *sequence alignment* dilakukan dengan cara membandingkan sekuens yang diperoleh dengan data DNA yang ada di *Gene Bank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Untuk melihat

hubungan kekerabatannya dengan spesies lainnya dilakukan dengan *software* ClustalW Versi 2 dan NJplot (Mustopa, 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ketahanan *Lactobacillus* spp. Isolat Susu Kambing Etawa pada pH Rendah

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua isolat uji (23 isolat) dapat tumbuh dengan baik pada medium yang memiliki pH 3 dan 4, walaupun terjadi sedikit penurunan nilai OD₆₆₀ yang berkisar antara 0,3% sampai 25,8% jika dibandingkan dengan pertumbuhan pada medium dengan pH 6.5 (kontrol). Hanya lima isolat yaitu *Lactobacillus* spp. (GMA37, GMA43, GMA46, GMA47 dan GMA50) mampu bertahan tumbuh pada medium dengan pH 2 (Tabel 1). Mekanisme pasti yang bertanggungjawab terhadap penurunan pertumbuhan BAL setelah dipapar dengan pH rendah belum dapat dijelaskan secara pasti dalam penelitian ini. Namun, mungkin erat kaitannya dengan terjadinya kerusakan dinding sel dan atau terganggunya aktivitas enzimatik pada sitoplasma seperti yang telah banyak dilaporkan. Penurunan laju pertumbuhan sel bakteri atau kematian sel bakteri ini menurut Yang *et al.*, (2001) disebabkan oleh terjadinya pengasaman dinding sel secara berlebihan yang menyebabkan rusaknya membran sel bakteri, sehingga komponen-komponen mineral penting sel, seperti Mg, K, dan lemak keluar dari dalam sel setelah terpapar kondisi asam.

Cotter dan Hill (2003); Slonczewski *et al.*, (2009) menyatakan bahwa untuk dapat bertahan pada pH rendah bakteri tahan asam akan mempertahankan kondisi pH internalnya relatif lebih tinggi daripada pH lingkungannya. Mekanisme ini dilakukan dengan cara mengaktifkan enzim ATP-ase, sehingga, dihasilkan cukup banyak energi untuk memindahkan proton dari dalam keluar sel. Ketahanan BAL terhadap lingkungan asam juga diduga disebabkan oleh adanya lapisan peptidoglikan yang tebal pada dinding sel bakteri Gram positif, sehingga membran seluler yang membatasi gerakan senyawa keluar ataupun masuk sel menjadi relatif lebih aman (Oh *et al.*, 2000).

Bervariasinya sifat ketahanan yang ditunjukkan oleh BAL isolat susu kambing etawa terhadap pH rendah (Tabel 1) menurut Oh *et al.*, (2000), disebabkan karena keragaman

Tabel 1. Ketahanan *Lactobacillus* spp. isolat susu kambing etawa pada pH rendah

Kode Isolat	Kontrol (pH 6,5)		pH 2		pH 3		pH 4	
	OD _{600nm} (*)	Penurunan OD (%)	OD _{600nm} (*)	Penurunan OD (%)	OD _{600nm} (*)	Penurunan OD (%)	OD _{600nm} (*)	Penurunan OD (%)
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA21	(2,010 ± 0,031)	98,1%	(0,038 ± 0,002) -	98,1%	(1,904 ± 0,003) +++	5,3%	(1,919 ± 0,099) +++	4,5%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA22	(2,022 ± 0,030)	98,2%	(0,036 ± 0,002) -	98,2%	(1,758 ± 0,014) +++	13,1%	(1,842 ± 0,267) +++	8,9%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA23	(2,247 ± 0,257)	97,4%	(0,058 ± 0,004) -	97,4%	(1,750 ± 0,190) +++	22,1%	(1,900 ± 0,045) +++	15,4%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA24	(2,034 ± 0,005)	98,2%	(0,037 ± 0,004) -	98,2%	(1,813 ± 0,012) +++	9,6%	(1,917 ± 0,032) +++	5,8%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA25	(2,036 ± 0,009)	99,3%	(0,015 ± 0,003) -	99,3%	(1,976 ± 0,036) +++	2,9%	(1,997 ± 0,022) +++	1,9%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA26	(1,009 ± 0,002)	94,3%	(0,058 ± 0,002) -	94,3%	(0,748 ± 0,107) ++	25,8%	(0,821 ± 0,131) +++	18,6%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA27	(1,989 ± 0,033)	98,9%	(0,023 ± 0,004) -	98,9%	(1,874 ± 0,088) +++	5,5%	(1,983 ± 0,009) +++	0,3%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA28	(2,128 ± 0,013)	97,2%	(0,059 ± 0,007) -	97,2%	(1,928 ± 0,021) +++	9,4%	(2,097 ± 0,044) +++	1,5%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA29	(2,016 ± 0,035)	97,4%	(0,053 ± 0,024) -	97,4%	(1,902 ± 0,009) +++	5,0%	(1,914 ± 0,032) +++	5,6%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA30	(2,033 ± 0,020)	98,5%	(0,031 ± 0,007) -	98,5%	(1,791 ± 0,086) +++	11,9%	(2,017 ± 0,042) +++	0,8%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA31	(2,003 ± 0,011)	98,3%	(0,034 ± 0,003) -	98,3%	(1,893 ± 0,034) +++	5,5%	(1,986 ± 0,006) +++	0,8%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA32	(1,986 ± 0,090)	99,2%	(0,015 ± 0,005) -	99,2%	(1,887 ± 0,123) +++	3,5%	(1,955 ± 0,037) +++	1,6%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA33	(2,134 ± 0,009)	96,6%	(0,072 ± 0,004) -	96,6%	(1,648 ± 0,024) +++	22,8%	(2,102 ± 0,022) +++	1,5%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA34	(2,038 ± 0,016)	98,3%	(0,035 ± 0,003) -	98,3%	(1,966 ± 0,026) +++	3,5%	(2,009 ± 0,017) +++	1,5%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA36	(2,141 ± 0,027)	96,3%	(0,078 ± 0,012) -	96,3%	(1,852 ± 0,090) +++	13,5%	(1,978 ± 0,201) +++	7,6%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA37	(2,136 ± 0,027)	94,2%	(0,123 ± 0,047) +	94,2%	(1,978 ± 0,070) +++	7,4%	(2,076 ± 0,057) +++	2,8%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA38	(2,122 ± 0,013)	97,4%	(0,055 ± 0,013) -	97,4%	(1,716 ± 0,016) +++	19,2%	(2,080 ± 0,011) +++	2,0%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA41	(2,108 ± 0,022)	96,9%	(0,066 ± 0,005) -	96,9%	(1,852 ± 0,027) +++	12,1%	(2,059 ± 0,044) +++	2,3%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA42	(2,148 ± 0,018)	96,8%	(0,068 ± 0,006) -	96,8%	(1,951 ± 0,032) +++	9,1%	(2,099 ± 0,015) +++	2,3%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA43	(2,129 ± 0,007)	94,9%	(0,108 ± 0,068) +	94,9%	(1,698 ± 0,116) +++	20,3%	(1,998 ± 0,062) +++	6,6%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA46	(2,089 ± 0,072)	72,8%	(0,568 ± 0,072) ++	72,8%	(1,959 ± 0,037) +++	6,2%	(2,006 ± 0,115) +++	3,9%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA47	(2,139 ± 0,004)	93,1%	(0,148 ± 0,008) +	93,1%	(1,970 ± 0,026) +++	7,9%	(1,987 ± 0,052) +++	7,1%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA50	(2,111 ± 0,020)	69,9%	(0,636 ± 0,034) ++	69,9%	(1,954 ± 0,023) +++	7,5%	(2,069 ± 0,101) +++	2,0%

*) Ketahanan ditentukan dengan mengukur OD_{600nm} pada isolat *Lactobacillus* spp. setelah diredam selama 3 jam pada medium MRS broth dengan pH yang berbeda. Nilai yang ditampilkan merupakan rata-rata dari tiga kali ulangan ± standar deviasi. Keterangan menurut Sujaya et al. (2008),

- = Apabila Absorbansi < 0,1 (tidak tahan asam)
- + = Apabila Absorbansi diantara 0,1 – 0,5 (sedikit tahan asam)
- ++ = Apabila Absorbansi diantara 0,5 – 1,0 (tahan asam)
- +++ = Apabila Absorbansi > 1,0 (sangat tahan asam)

struktur asam lemak dan protein pada membran sitoplasma pada setiap galur BAL dan kemungkinan bersifat *strain dependent*. Keragaman struktur membran sel ini yang memengaruhi karakteristik permeabilitas membran sitoplasma setiap galur terhadap lingkungan pH rendah.

Ketahanan *Lactobacillus* spp. Isolat Susu Kambing Etawa terhadap Natrium Deoksi Kolat

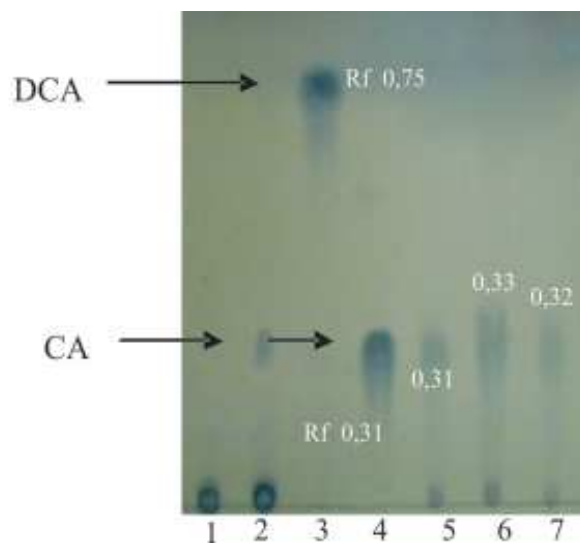
Pada uji ini semua isolat BAL mampu bertahan pada medium yang mengandung 0,2 mM NaDC dan sebanyak 19 isolat tahan pada 0,4 mM NaDC. Tetapi, hanya 10 isolat *Lactobacillus* spp. (GMA24, GMA25, GMA32, GMA33, GMA34, GMA38, GMA41, GMA46, GMA47, dan GMA50) yang mampu bertahan pada medium mengandung 0,6 mM NaDC (Tabel 3). Jika dibandingkan dengan kontrol, pertumbuhan semua isolat BAL yang digunakan dalam penelitian ini mengalami penurunan sebesar 42,2% sampai 98,4%. Penurunan pertumbuhan semakin besar seiring peningkatan konsentrasi NaDC dalam medium (Tabel 2).

Adanya NaDC dapat memengaruhi permeabilitas membran sel. Terganggunya permeabilitas membran sel bakteri menyebabkan bakteri tidak mampu mengontrol aktivitas difusi molekul keluar masuk sel, sehingga sel mengalami lisis dan akhirnya mati (Murad *et al.*, 2010). Oleh karena itu, peranan komponen dan struktur dinding sel BAL memengaruhi ketahanannya terhadap NaDC. Ruiz *et al.*, (2007), Taranto *et al.*, (2003) melaporkan bahwa sifat resistensi ini berkaitan dengan peran polisakarida sebagai penyusun dinding sel dan tebalnya lapisan peptidoglikan yang dimiliki oleh kelompok bakteri Gram positif.

Pada penelitian ini, semua isolat *Lactobacillus* menunjukkan sifat ketahanan yang berbeda-beda terhadap garam empedu. Bervariasinya ketahanan setiap isolat *Lactobacillus* terhadap garam empedu dilaporkan oleh Gomez-Zavaglia *et al.*, (2002) disebabkan oleh perubahan struktur asam lemak pada membran sel bakteri sehingga, memengaruhi sifat permeabilitas membran sel terhadap garam empedu.

Konversi Asam Kolat Menjadi Asam Deoksi Kolat oleh *Lactobacillus* spp.

Dari karakterisasi yang telah dilakukan dipilih tiga isolat *Lactobacillus* spp. (GMA46, GMA47, dan GMA50) sebagai isolat yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai probiotik untuk dilakukan karakterisasi selanjutnya. Ketiga isolat *Lactobacillus* spp. (GMA46, GMA47, dan GMA50) tidak melakukan transformasi asam kolat primer CA menjadi asam kolat sekunder DCA (Gambar 1). Hasil ini menunjukkan bahwa ketiga isolat diduga tidak memiliki gen 7α -dehidroksilase yang diduga bekerja memutus ikatan hidroksi pada senyawa asam kolat (Wells *et al.*, 2003), meskipun penelitian lebih lanjut terkait keberadaan gen tersebut masih perlu dilakukan. Mengingat pembentukan deoksi kolat menunjukkan indikasi galur yang tidak aman, karena deoksikolat adalah promotor kanker saluran pencernaan. Dengan demikian, pembentukan deoksi kolat oleh galur probiotik tidak diharapkan (Kitahara *et al.*, 2000). Berdasarkan hal tersebut ketiga isolat *Lactobacillus* spp. (GMA46, GMA47, dan GMA50) berpotensi untuk dikembangkan sebagai probiotik lokal.



Gambar 1. Transformasi CA oleh *Lactobacillus* spp. isolat susu kambing etawa. (1) MRS broth, (2) MRS broth ditambahkan dengan CA, (3) asam deoksikolat (DCA), (4) asam kolat (CA), (5) *Lactobacillus* sp. GMA46, (6) *Lactobacillus* sp. GMA47, (7) *Lactobacillus* sp. GMA50

Tabel 2. Ketahanan *Lactobacillus* spp. isolat susu kambing etawa pada sodium deoksikolat

Kode Isolat	Kontrol	NaDC 0,2 mM		NaDC 0,4 mM		NaDC 0,6 mM	
		OD _{660nm} (*)	Penurunan OD (%)	OD _{660nm} (*)	Penurunan OD (%)	OD _{660nm} (*)	Penurunan OD (%)
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA21	(1,772 ± 0,367)	(0,784 ± 0,011) ++	55,8%	(0,268 ± 0,028) +	84,9%	(0,049 ± 0,016) -	97,2%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA22	(2,060 ± 0,143)	(0,703 ± 0,006) ++	65,9%	(0,165 ± 0,045) +	92,0%	(0,083 ± 0,032) -	96,0%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA23	(1,896 ± 0,246)	(0,378 ± 0,005) +	80,1%	(0,178 ± 0,071) +	90,6%	(0,044 ± 0,047) -	97,7%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA24	(2,078 ± 0,003)	(0,289 ± 0,041) +	86,1%	(0,237 ± 0,012) +	88,6%	(0,127 ± 0,013) +	93,9%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA25	(2,105 ± 0,018)	(0,958 ± 0,237) ++	54,5%	(0,208 ± 0,151) +	90,1%	(0,102 ± 0,008) +	95,2%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA26	(1,154 ± 0,014)	(0,350 ± 0,025) +	69,7%	(0,193 ± 0,100) +	83,3%	(0,052 ± 0,021) -	95,5%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA27	(2,036 ± 0,081)	(0,628 ± 0,099) ++	69,2%	(0,511 ± 0,008) +	74,9%	(0,043 ± 0,129) -	97,9%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA28	(2,070 ± 0,081)	(0,516 ± 0,012) ++	75,1%	(0,099 ± 0,006) -	95,2%	(0,041 ± 0,028) -	98,0%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA29	(1,846 ± 0,297)	(0,291 ± 0,017) +	84,2%	(0,042 ± 0,002) -	97,7%	(0,029 ± 0,004) -	98,4%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA30	(2,000 ± 0,065)	(0,408 ± 0,066) +	79,6%	(0,251 ± 0,008) +	87,4%	(0,033 ± 0,006) -	98,3%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA31	(1,213 ± 0,021)	(0,318 ± 0,062) +	73,7%	(0,058 ± 0,003) -	95,2%	(0,048 ± 0,039) -	96,1%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA32	(2,072 ± 0,111)	(1,139 ± 0,021) +++	45,0%	(0,229 ± 0,024) +	88,9%	(0,112 ± 0,061) +	94,6%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA33	(2,086 ± 0,025)	(0,775 ± 0,171) ++	62,9%	(0,274 ± 0,012) +	86,9%	(0,166 ± 0,065) +	92,0%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA34	(2,057 ± 0,067)	(1,188 ± 0,083) +++	42,2%	(0,240 ± 0,021) +	88,3%	(0,144 ± 0,071) +	93,0%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA36	(2,105 ± 0,028)	(0,623 ± 0,034) ++	70,4%	(0,154 ± 0,034) +	92,7%	(0,074 ± 0,022) -	96,5%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA37	(2,110 ± 0,011)	(1,054 ± 0,193) +++	50,0%	(0,062 ± 0,003) -	97,1%	(0,051 ± 0,020) -	97,6%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA38	(2,286 ± 0,307)	(0,901 ± 0,171) ++	60,6%	(0,223 ± 0,022) +	90,3%	(0,126 ± 0,045) +	94,5%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA41	(2,093 ± 0,013)	(0,548 ± 0,111) ++	73,8%	(0,215 ± 0,053) +	89,7%	(0,197 ± 0,025) +	90,6%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA42	(2,091 ± 0,027)	(0,901 ± 0,131) ++	56,9%	(0,202 ± 0,106) +	90,4%	(0,073 ± 0,033) -	96,5%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA43	(2,112 ± 0,020)	(0,633 ± 0,112) ++	70,0%	(0,123 ± 0,005) +	94,2%	(0,049 ± 0,014) -	97,7%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA46	(2,119 ± 0,028)	(0,709 ± 0,084) ++	66,5%	(0,265 ± 0,063) +	87,5%	(0,169 ± 0,067) +	92,0%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA47	(2,110 ± 0,028)	(0,962 ± 0,183) ++	54,4%	(0,232 ± 0,044) +	89,0%	(0,155 ± 0,029) +	92,7%
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA50	(2,086 ± 0,021)	(1,108 ± 0,155) +++	46,9%	(0,281 ± 0,038) +	86,5%	(0,108 ± 0,046) +	94,8%

*) Ketahanan ditentukan dengan menggunakan OD_{660nm} pada isolat *Lactobacillus* spp. setelah ditumbuhkan selama 24 jam pada medium MRS broth dengan NaDC. Nilai yang ditampilkan merupakan rata-rata dari tiga kali ulangan ± standar deviasi.

Keterangan menurut Sujaya *et al.* (2008),

- = Apabila Absorbansi < 0,1 (tidak tahan NaDC)
- + = Apabila Absorbansi diantara 0,1 – 0,5 (sedikit tahan NaDC)
- ++ = Apabila Absorbansi diantara 0,5 – 1,0 (tahan NaDC)
- +++ = Apabila Absorbansi > 1,0 (sangat tahan NaDC)

Ketahanan *Lactobacillus* spp. Isolat Susu Kambing Etawa pada Model Kondisi Saluran Pencernaan Bagian Atas

Dalam uji ketahanan terhadap kondisi saluran pencernaan bagian atas, *Lactobacillus* spp. GMA47 hanya mampu melewati kondisi lambung pH 3 dan 4, sedangkan *Lactobacillus* spp. GMA50 hanya mampu melewati kondisi lambung pada pH 4 (Tabel 3). Selanjutnya, sel yang telah mengalami *injury* lebih mudah mati setelah terpapar dalam lingkungan usus dengan DCA dan pankreatin, sehingga setelah empat jam dipaparkan pada kondisi ini tidak ditemukan pertumbuhan kedua isolat pada medium MRS agar (Tabel 3). Hasil tersebut menunjukkan bahwa *Lactobacillus* spp. GMA47 dan *Lactobacillus* spp. GMA50 diperkirakan tidak akan mampu mencapai kolon dalam keadaan hidup.

Respons yang sedikit berbeda ditunjukkan oleh *Lactobacillus* spp. GMA46 yang mampu tumbuh dengan baik pada ketiga variasi pH dalam uji ini. *Lactobacillus* spp. GMA46 ini juga menunjukkan respons yang baik setelah secara kontinyu dipaparkan pada kondisi cairan usus pada pH 3 atau pH 4 selama empat jam (Tabel 3). Hasil ini mengindikasikan secara *in vitro* bahwa *Lactobacillus* spp. GMA46 mampu mencapai kolon dalam keadaan hidup.

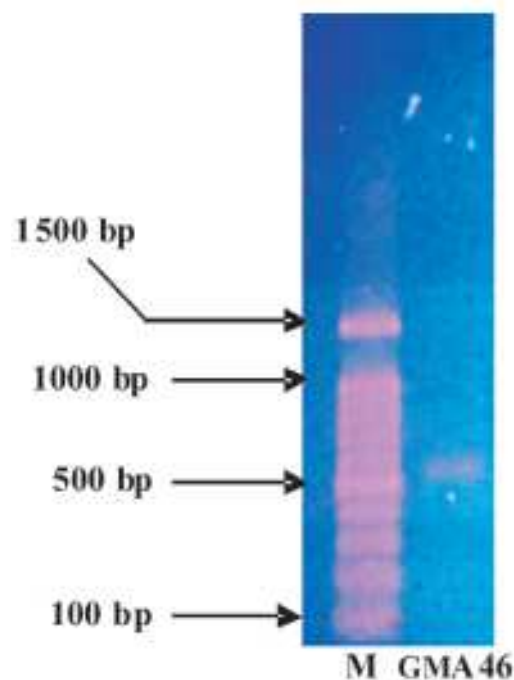
Ketahanan isolat *Lactobacillus* spp. GMA46 pada simulasi cairan lambung diduga akan memengaruhi ketahanannya pada simulasi cairan usus yang diketahui mengandung pankreatin dan deoksikolat yang bersifat sebagai detergen biologis bagi mikroorganisme. Hal tersebut ditunjukkan oleh jumlah populasi sel dari *Lactobacillus* spp. GMA46 lebih besar 4 log (40x) pada akhir perjalanan saat melewati saluran pencernaan bagian atas selama 8,5 jam daripada kedua isolat lainnya (Tabel 3). Hal serupa juga dilaporkan oleh Sujaya *et al.*, (2008) yang menyatakan bahwa sel yang telah melewati simulasi cairan lambung, akan lebih peka terhadap keadaan yang tidak menguntungkan pada kolon (usus besar), sehingga strain mampu beradaptasi pada lingkungan tersebut. Selain itu, jumlah populasi yang diperkirakan berhasil mencapai saluran pencernaan bagian bawah (kolon) juga sangat ditentukan oleh pH pada lambung.

Menurut Shah (2007), bakteri probiotik memiliki efek menyehatkan pada lingkungan usus apabila jumlah populasinya mencapai minimal 10^6 - 10^8 CFU/mL. Berdasarkan hal tersebut isolat *Lactobacillus* spp. GMA46 lebih

berpotensi untuk dikembangkan menjadi probiotik daripada kedua isolat lain (*Lactobacillus* spp. GMA47 dan *Lactobacillus* spp. GMA50).

Identifikasi *Lactobacillus* spp. GMA46

Identifikasi molekuler BAL isolat susu kambing etawa sangat penting dilakukan agar identitas BAL tersebut dapat diketahui. *Lactobacillus* spp. GMA46 merupakan isolat yang paling potensial untuk dikembangkan menjadi probiotik dari 23 *Lactobacillus* spp. yang dikarakterisasi dalam penelitian ini, sehingga diidentifikasi pada penelitian ini. Hasil BLAST-N pada variabel area 1-3 pada PCR 16S rDNA (dengan ukuran gen sepanjang \pm 500bp) (Gambar 2 dan Tabel 4), menunjukkan *Lactobacillus* sp GMA46 memiliki homologi (kemiripan) dengan *Lactobacillus casei* dan *L. paracasei* sebesar 100%. Hasil ini mengindikasikan bahwa sekuen nukleotida pada bagian variabel area 1-3 dari 16S rDNA tidak dapat membedakan *L. casei* ATCC 334 dengan *L. paracasei subsp. tolerans strain* NBRC 15906, sehingga perlu dilakukan indentifikasi secara lengkap (*full sequence*). Selain itu, identifikasi



Gambar 2. Hasil PCR 16S rDNA *Lactobacillus* sp. GMA46 isolat susu kambing etawa pada agarosa 1,2%. Keterangan: (M) marker (1) *Lactobacillus* sp. GMA46

Tabel 3. Ketahanan *Lactobacillus* spp. isolat susu kambing etawa pada model kondisi saluran pencernaan

Strain	Populasi <i>Lactobacillus</i> spp. CFU/mL (*)									
	Populasi Awal	1,5 jam			3 jam			4 jam		
		PH 4	PH 3	PH 2	PH 4	PH 3	PH 2	PH 4	PH 3	PH 2
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA46	6,2x10 ⁹	7,5x10 ⁸	5,2x10 ⁸	4,7x10 ⁸	5,2x10 ⁸	4,0x10 ⁸	9,3x10 ⁷	1,5x10 ⁷	4,0x10 ⁵	0
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA47	2,6x10 ⁹	12,6x10 ⁸	1,2x10 ⁸	0	9,0x10 ⁷	2,0x10 ⁷	0	0	0	0
<i>Lactobacillus</i> spp. GMA50	5,2x10 ⁸	1,0 x10 ⁶	0	0	0	0	0	0	0	0

*) CFU/mL dihitung setelah sel direndam selama 1,5 jam dan 3 jam pada model cairan getah lambung mengandung 0,1 % pepsin pH 2, 3 dan 4 dan dilanjutkan direndam dalam model cairan usus mengandung 0,1% pankreatin dan 0,2 mM deoksikolat pH 8 selama 4 jam dan di kultur pada MRS agar.

Tabel 4. Homologi sekuen 16S rDNA *Lactobacillus* sp. GMA46 dengan strain lainnya pada Gene Bank

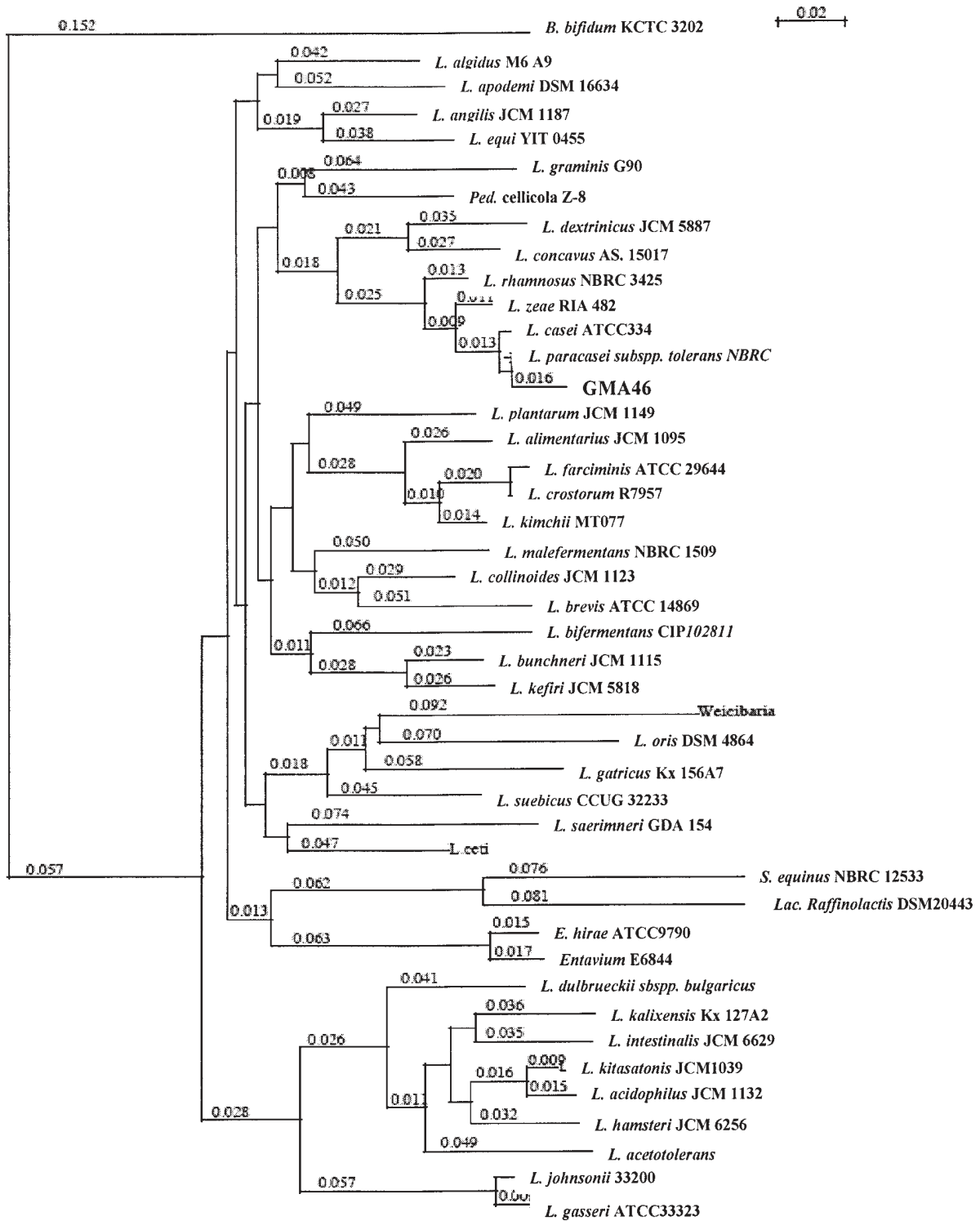
Isolat	Spesies Bakteri Asam Laktat Homolog	Similarity (%)	Panjang Basa (bp)	Kode Akses
GMA46	<i>L. casei</i> ATCC 334	100%	480/480	NR_075032.1
	<i>L. paracasei</i> subspp. <i>tolerans</i> strain NBRC 15906	100%	480/480	NR_041054.1
	<i>L. paracasei</i> subspp. <i>paracasei</i> strain R094	100%	480/480	NR_025880.1
	<i>L. paracasei</i> subspp. <i>paracasei</i> strain NBRC 15889	99%	479/480	NR_113337.1
	<i>L. paracasei</i> strain ATCC 25302	99%	479/480	NR_117987.1
	<i>L. paracasei</i> 16S ribosomal	99%	469/480	NR_121787.1
	<i>L. zeae</i> strain RIA 482	98%	469/480	NR_037122.1
	<i>L. casei</i> strain NBRC 15883	98%	468/480	NR_113333.1
	<i>L. casei</i> strain ATCC 393	98%	469/481	NR_041893.1
	<i>L. casei</i> strain JCM 1134	97%	467/481	NR_115534.1

dengan menggunakan *Intragenic Spencer Region* (IGS) atau dengan menggunakan API CHL50 juga perlu dilakukan untuk mendukung hasil identifikasi 16S rDNA.

Komisi Yudisial Bakteriologi di Kota Catania, Italia pernah menolak pengajuan Dellaglio *et al.*, (2002) mengenai pensejajaran *L. casei* ATCC 334 sebagai *type strain* menggantikan *L. casei* ATCC 393, sehingga tetap menetapkan *L. casei* ATCC 393 sebagai *type strain*. Berdasarkan hasil BLAST-N yang ditunjukkan pada Tabel 4 diketahui bahwa GMA46 memiliki homologi yang lebih rendah yaitu sebesar 98% dengan *type strain L. casei* ATCC 393 dibandingkan dengan kelompok *L. paracasei* yang lain. Berdasarkan hal tersebut maka isolat GMA46 lebih dekat kekerabatannya dengan *L. paracasei* (Gambar 3).

Bakteri *L. paracasei* banyak dimanfaatkan dalam produksi makanan terfermentasi seperti *yogurt* dan keju. Bakteri ini dapat tumbuh

dengan baik pada proses pematangan keju (*ripening*), tahan terhadap kondisi pemanasan, dan memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi (Ibrahim *et al.*, 2013; Madureira *et al.*, 2008). Radulovic *et al.*, (2010) melaporkan bahwa *L. paracasei* memiliki ketahanan yang baik pada kondisi pH rendah dan garam empedu 0,3% serta menunjukkan adhesi yang sangat baik pada jaringan epitel manusia. Paineau *et al.*, (2008) menambahkan bahwa *L. paracasei* juga diketahui berperan sebagai imunomodulator untuk meningkatkan kemampuan sistem kekebalan tubuh inangnya. Beberapa strain *L. paracasei* dilaporkan Hutt *et al.*, (2006) mampu menghasilkan bakteriosin, sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen saluran pencernaan. Berdasarkan hal tersebut, tidak menutup kemungkinan jika klaim efek menyehatkan yang ditimbulkan dari konsumsi susu kambing etawa disebabkan oleh adanya *L. paracasei* pada susu tersebut.



Gambar 3. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen 16S rDNA dari *Lactobacillus* sp. GMA4

SIMPULAN

Bakteri *Lactobacillus* sp. GMA46 yang memiliki kemiripan terdekat dengan *L. paracasei* subsp. *tolerans* strain NBRC 15906 merupakan isolat yang paling potensial dikembangkan sebagai probiotik.

SARAN

Penelitian lanjutan yang perlu dilakukan adalah uji *in vivo* *Lactobacillus* sp. GMA46 pada hewan coba untuk mengetahui efek fungsional menyehatkan yang ditimbulkan oleh isolat ini. Analisis urutan pasang basa lengkap pada gen 16S rDNA isolat ini perlu dilakukan untuk mengetahui identitas strain yang lebih detail.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada petani yang tergabung dalam kelompok tani Werdi Gopala di Desa Pucaksari, Kecamatan Busung Biu, Kabupaten Buleleng, Bali yang telah membantu dalam penyediaan susu segar kambing etawa. Selain itu, ucapan terima kasih juga ditujukan kepada LPPM (Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat) Universitas Udayana yang telah membantu secara finansial melalui kontrak dengan nomor 174.11/UN14.2/PNL.03.00/2013, tertanggal 16 Mei 2013, dan kepada UPT Lab. Terpadu Biosain dan Bioteknologi Universitas Udayana atas fasilitas yang diberikan selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Cotter PD, Hill C. 2003. Surviving the acid test : responses of Gram-positive bacteria to low pH. *J Microbiol Mol Biol Rev* 67 (3): 429-453.
- Dellaglio F, Felis GE, Torriani S. 2002. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* (Collins et al. 1989). Request for an opinion. *Int J of Syst and Evol Microbiol* 52: 285–287.
- Fernandez M, Boris F, Barbes C. 2003. Probiotic properties of human *Lactobacilli* strains to be used in the gastrointestinal tract. *J App Microbiol* 94: 449-455.
- Guessas B Kihal M. 2004. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian Arid Zone raw goats milk. *Afr J Biotech* 3(6): 339-342.
- Gomez Z, Kociubinski G, Perez P, Antoni D. 2002. Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. *J Appl Microbiol* 93: 794–799.
- Hutt P, Shchepetova J, Loivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M. 2006. Antagonistic activity of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* against entero and urpathogens. *J Appl Microbiol* 100: 1324-1332.
- Ibrahim GA, Barakat OS, Tawfik NF, Kholy E, Rab GE. 2013. Viability of *Lactobacillus paracasei* 441 produced by batch and continuous biofilm reactor in some dairy products. *J App Sci Research* 9(8): 4734-4744.
- Kitahara M, Takamine F, Imamura T, Benno Y. 2002. Assigemnt of *Eubacterium* spp. VPI 12708 and related strains with high bile acid 7°-dehydroxylating activity of *Clostridium scindens* and proposal of *Clostridium hylemonae* ap.nov., isolated from human feces. *Int J Syst Envol Microbiol* 50: 971-978.
- Kurdi P, Veen HW, Tanaka H, Mierau I, Konings WN, Tannock GW, Tomita F, Yakorta A. 2000. Cholic acid is accumulated spontaneously driven by membrane “pH in my *Lactobacilli*. *J Bacteriol* 182: 6525-6528
- Lipsy P. 2010. Thin layer chromatography characterization of the active ingredients in excedrin and anacin. USA: Department of Chemistry and Chemical Biology, Stevens Institute of Technology.
- Madureira AR, Soares JC, Pintado ME, Gomes AP, Freitas AC, Malcata FX. 2008. Sweet whey cheese matrices inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LAFTI_L26. *J Dairy Sci Technol* 88: 649-655.
- Moeljanto RD. 2002. *Khasiat dan manfaat susu kambing, susu terbaik dari hewan ruminansia*. Jakarta. PT. Agro Media Pustaka.
- Mustopa A. 2009. *Koleksi protokol laboratorium virologi molekuler*. Bogor. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

- Murad HA, Rafea RI, Aly EM. 2001. Utilization of UF permeate for production of α -galactosidase by lactic acid bacteria. *J Microbiol* 60(2): 139-144.
- Nucleo Spin®Tissue. 2010. User manual, Genomic DNA from tissues. Rev 11. Germany: Macherey-Nagel (MN) Inc.
- Oh S, Kim SH, Worobo RW. 2000. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J Dairy and Food Sci* 83: 2747-2752.
- Paineau D, Carcano D, Leyer G, Darquy S, Alyanakian MA, Simoneau G, Bergmann JF, Brassart D, Bornet F, Ouwehand AC. 2008. Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. *J FEMS Immunol and Med Microbiol* 53(1): 107–113.
- Peter JB, Helen MK, Ian GM, Yvonne V, Jonathan GB, Philip RE, Harvey TM. 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin bar structure. *J Origin Sci Research* 303 (5657): 495-499.
- Radulovic V, Petrovic T, Nedovic V, Dimitrijevic S, Mirkovic N, Petrusic M, Paunovic D. 2010. Characterization of autochthonous *lactobacillus paracasei* strain on potential probiotic ability. *J Mljekarstvo* 60(2) 86-93.
- Rozila I, Ezni S, Lani MN, Sharina MD, Siti HM, Asma H, Sharida MD. 2012. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from goats' milk. International Annual Symposium on Sustainability Science and Management. Terengganu, Malaysia. 09-11 Juli 2012.
- Ruiz L, Sanchez B, Madiedo R, Gavilan R, Margolles A. 2007. Cell envelope changes in *Bifidobacterium animalis* sspp. *lactis* as a response to bile. *J FEMS Microbiol* 274: 316–322.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*, 3rd Ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Setyawardani T. 2012. Karakteristik dan pemanfaatan bakteri asam laktat asal susu kambing untuk pembuatan keju dengan sifat probiotik. (Thesis). Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Shah NP. 2007. Functional cultures and health benefits. *J Int Dairy* 17: 1262-1277.
- Slonczewski JL, Fujisawa M, Dopson M, Krulwich TA. 2009. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. *J Microbial Phys* 55: 2-56.
- Sujaya IN, Ramona Y, Widarini NP, Suariani NP, Dwipayanti NMU, Nocianitri KA, Nursini NW. 2008. Potensi *Lactobacillus* spp. isolat susu kuda sumbawa sebagai probiotik. *J Veteriner* 9(1): 33-40.
- Sutama IK, Budiarsana. 2000. Etawah grade goats as the source of income of farmers in Indonesia. *J Live Research* 1: 81-85.
- Taranto MP, Murga ML, Lorca G, Valdez D. 2003. Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *J App Microbiol* 26: 117-124
- Wells JE, Williams KB, Whitehead TR, Hermanand DM, Hylemon PB. 2003. Development and application of polymerase chain relation assay for the detection and enumeration of bile acid 7 α -dehydroxylating bacteria in human feces. *J Clin Chim Acta* 33: 127-134.
- Yang YS, Chen MC, Liao CC. 2001. Mutant *Bifidobacteria* strains with acid, bile salt and oxygen tolerance. *J US Pat App* 38: 63-66.
- Yoshida D. 2004. Screening for Secondary Bile Acid Producing Bacteria Isolated From Human Feces. (Thesis). Hokkaido. Hokkaido University
- Zareie M, Johnson H, Jury K, Yang PC. 2006. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *J Gut* 55: 55–60.