

Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Isolat Susu Segar Sapi Bali

(IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION
OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM BALI CATTLE'S RAW MILK)

I Nengah Sujaya^{1,2*}, Komang Ayu Nocianitri⁴, Ni Putu Desy Aryantini²,
Wayan Nursini², Yan Ramona^{2,3}, Yoshitake Orikasa⁶,
Fukuda Kenji⁵, Tadashu Urashima⁵, Yuji Oda⁶

¹Program Studi Ilmu Kesehatan Masyarakat, Universitas Udayana,
Jl Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia,
Tel/Fax : +62 361 701 805; *Email : sakabali@hotmail.com

²UPT. Laboratorium Terpadu Biosain dan Bioteknologi, Unud,

³Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Unud

⁴Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Unud,

⁵Department of Animal and Food Hygiene, ⁶Department of Food Science,
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,
Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

ABSTRAK

Sapi bali merupakan salah satu spesies *indigenous* khas Bali yang mendapat perhatian besar karena keunikannya. Penelitian tentang penyakit, nutrisi serta pemuliaan hewan ini telah banyak dipublikasikan, tetapi belum banyak laporan penelitian mendalam tentang bakteri asam laktat (BAL) yang terdapat dalam susu sapi bali serta potensi pemanfaatannya sebagai probiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi BAL pada susu sapi bali serta ketahanannya pada asam kolat sebagai salah satu syarat pengembangannya sebagai probiotik. Hasil identifikasi berdasarkan kesamaan susunan basa nukleotida pada *variable region* I, II, dan III pada molekul 16S rDNA menunjukkan bahwa 44 dari 62 isolat BAL yang diisolasi dari susu sapi bali memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Pediococcus acidilactici*, sebanyak 11 isolat memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Enterococcus gallinarum*, lima isolat memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Lactococcus garviae*, dan masing-masing satu isolat memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Lactobacillus plantarum* dan *Weissella confusa*. Beberapa isolat mempunyai ketahanan yang baik pada 0,2-0,6 mM deoksi kolat, jenis asam empedu sekunder utama pada saluran pencernaan manusia, sehingga BAL tersebut berpotensi dapat bertahan hidup pada saluran pencernaan manusia. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa spesies BAL yang dominan pada susu segar sapi bali mempunyai hubungan kekerabatan yang erat dengan *P. acidilactici*, *E. gallinarum*, *Lac. garviae*, *Lb. plantarum*, dan *W. confusa*, serta berbeda dengan BAL yang umumnya terdapat pada susu sapi segar lainnya. Beberapa isolat potensial dikembangkan sebagai probiotik untuk meningkatkan kesehatan manusia.

Kata-kata kunci : susu sapi bali, bakteri asam laktat, 16S rDNA, probiotik

ABSTRACT

Bali cattle is an indigenous species in Bali, which pay great attention due to its uniqueness. Numerous articles have been published on Bali cattle especially related to its disease, nutritional requirement for growth and domestication. Nevertheless, it was no any report has been published on the lactic acid bacteria (LAB) associated with the cattles raw milk and its potential used as probiotic. This work is aimed to identify LAB isolated from bali cattle raw milk and its resistance to secondary bile acid (sodium deoxy cholic), a prerequisite in development of probiotic for human. The results revealed that based upon the homology studies of the variable region I, II, and III sequences of the 16S rDNA showed that 44 out of 62 isolates were closely related to *Pediococcus acidilactici*; 11 out of 62 isolats were closely related to *Enterococcus gallinarum*, five out of 62 isolates were closely related to *Lactococcus garviae*, while only one isolate was

closely related to *Lactobacillus plantarum* and *Weissella confusa*. Some isolates showed resistant to 0.2-0.6 mM deoxy cholic acid, which might be also resist in human gastrointestinal tract conditions. Based on those finding, it can be concluded that the LAB associated with raw bali cattle milk were closey related to *P. acidilactici*, *E. gallinarum*, *Lac. garvieae*, *Lb. plantarum* and *W. confusa*, which different from those commonly LAB found in others cattle raw milk. Some isolates were potential to be developed as probiotic from human helath.

Key words: Bali cattle milk, lactic acid bacteria, 16S rDNA, probiotic

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan golongan bakteri yang telah digunakan secara luas sebagai *starter* untuk memproduksi bahan pangan seperti *yogurt*, keju, dan sosis (Antara, 2002; Tserovska, 2002; Zhu *et al.*, 2009). Berdasarkan sejarah panjang keamanan konsumsi pangan yang diproduksi dengan mempergunakan BAL, sehingga golongan bakteri ini diakui mempunyai keamanan setara bahan pangan (*food-grade*). Berdasarkan manfaat kesehatan yang diakibatkan oleh konsumsi bahan pangan yang diproduksi dengan melibatkan BAL tersebut, telah terbukti juga bahwa BAL tersebut dapat berkembang biak pada saluran pencernaan manusia sehingga menyebabkan terjadinya perubahan keseimbangan bakteri saluran pencernaan yang memberikan efek menyehatkan. Hal ini mendorong pemanfaatan BAL di era sekarang ini tidak hanya untuk memproduksi bahan pangan tetapi juga sengaja dirancang untuk memodifikasi bakteri saluran pencernaan manusia yang populer dengan istilah probiotik. Publikasi ilmiah tentang manfaat probiotik bagi kesehatan telah banyak dilakukan seperti menurunkan kadar kolesterol, meringankan reaksi alergi terhadap laktosa, memproduksi vitamin B, meningkatkan absorpsi kalsium, memodulasi sistem imun, mencegah infeksi berbagai bakteri patogen, dan mengurangi risiko kanker kolon (Ouweland, 1999). Manfaat BAL bagi kesehatan ini mendorong ilmuwan untuk mengisolasi BAL dari berbagai sumber dan mengeksplorasi potensi efek fungsionalnya untuk meningkatkan kesehatan manusia.

Bakteri asam laktat dapat diisolasi dari berbagai sumber alam, seperti dari tanah, tanaman, air, limbah dan juga dari saluran genital dan pencernaan manusia dan hewan. Dalam sejarahnya, BAL untuk pertama kalinya diisolasi dari susu (Carr *et al.*, 2002), selanjutnya juga ditemukan pada berbagai jenis makanan dan produk pangan terfermentasi seperti daging, susu, dan sayuran (Liu, 2003).

Air susu kaya akan protein, lemak, karbohidrat (terutama laktosa), vitamin dan mineral (Park *et al.*, 2007), dan menjadi habitat yang ideal bagi pertumbuhan mikroorganisme. Komponen karbohidrat utama pada susu adalah laktosa, yang difermentasi oleh mikroorganisme, khususnya golongan BAL, untuk pertumbuhannya dan menghasilkan metabolit utama berupa asam laktat yang mengakibatkan susu menjadi asam. Umumnya susu yang dikonsumsi oleh masyarakat diperoleh dari susu sapi dan susu kambing. Namun, ada juga yang memanfaatkan susu dari sumber lain seperti susu banteng air, domba, unta, dan kuda (Cheriguene *et al.*, 2007; Sujaya *et al.*, 2008). Di Indonesia, masyarakat lebih banyak mengkonsumsi susu sapi, meski di daerah Sumbawa konsumsi susu kuda liar lebih populer karena khasiatnya yang menyehatkan dan di Sumatera masyarakat mengkonsumsi susu kerbau dan dadih. Sapi bali (*Bos sondaicus*) merupakan satu-satunya plasma nutfah Bali yang memiliki keunggulan dibandingkan dengan sapi dari varietas yang lainnya. Sapi bali umumnya dimanfaatkan sebagai penghasil daging, dan sampai saat ini masyarakat belum memanfaatkan susu sapi bali untuk dikonsumsi (Martoyo, 2011).

Sementara itu, di berbagai negara berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengetahui bakteri asam laktat pada susu mentah hewan mamalia seperti sapi, kambing, domba (Aziz *et al.*, 2009; Boukhemis *et al.*, 2009; Cheriguene *et al.*, 2007; Elgadi *et al.*, 2008; Francois *et al.*, 2008; Guessas dan Kihal, 2004; Hagi *et al.*, 2010; Marion *et al.*, 2008) dan dari kuda (Sujaya *et al.*, 2008a,b). Pada tahun 2007 dipublikasikan tentang diversitas bakteri asam laktat dan potensi bioteknologi dari cairan rumen sapi bali (Suardana *et al.*, 2007), tetapi sampai saat ini belum ada publikasi tentang BAL yang diisolasi dari susu sapi bali. Mengingat sapi bali merupakan spesies khas asli Pulau Bali, maka sangat menarik dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi BAL pada susu sapi bali. Identifikasi bakteri asam laktat secara umum dilakukan dengan mempergunakan sifat

fisiologis dalam fermentasi berbagai jenis karbohidrat yang secara komersial dapat dilakukan dengan mempergunakan API CHL (Sujaya *et al.*, 2008a). Perubahan dan sifat isolat yang berbeda akan memberikan respons yang berbeda pada kemampuannya memanfaatkan karbohidrat sebagai sumber energi sehingga akan menghasilkan identitas yang kurang tepat. Telah diketahui bahwa materi genetik, khususnya 16S rDNA dipakai sebagai salah satu target dalam klasifikasi prokaryot (Neef *et al.*, 1990) sehingga identifikasi dapat dilakukan dengan lebih cepat dan tepat dalam klasifikasi prokaryot termasuk golongan BAL (Mori *et al.*, 1997; Sujaya *et al.*, 2000). Dengan demikian maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui spesies BAL yang diisolasi dari susu sapi bali serta potensinya sebagai probiotik berdasarkan sifat ketahanannya pada sodium deoksi kolat.

METODE PENELITIAN

Isolasi Bakteri Asam Laktat

Susu sapi bali dikoleksi dari tiga ekor sapi bali di Desa Tegalalang, Gianyar, Bali pada Bulan Maret hingga April 2010. Sampel susu dikoleksi dari sapi bali yang sedang menyusui setelah diinjeksi dengan 4 mL hormon oksitosin mengandung 10 IU/mL (*Oxytocin 10[®]*, *Interchemie, Holland*). Sapi bali dipelihara dengan cara mengandangkan dan diberikan pakan hijau tanpa konsentrat. Sebanyak 100 µL susu sapi bali segar dikultur pada media *Man Regosa and Sharpe* (MRS) *broth* (*Pronadisa, Spain*) yang mengandung: *dextrose* 20,0 g/L; *bacteriological peptone* 10,0 g/L; *beef extract* 8,0 g/L; *sodium acetate* 5,0 g/L; *yeast extract* 4,0 g/L; *dipotassium phosphate* 2,0 g/L; *tween 80* 1,0 g/L; *ammonium citrate* 2,0 g/L; *magnesium sulphate* 0,2 g/L, *magnesium sulphate* 0,05 g/L dan diinkubasi pada kondisi anaerob pada suhu 37°C selama 24-48 jam menggunakan *AnaeroPack Rectangular Jar* (*Mitsubishi Gas Chemical, Japan*) dengan *Anaerobic System BR0038B* (Oxoid, UK). Koloni BAL yang tumbuh selanjutnya diencerkan secara bertingkat dan disebar pada media MRS Agar (*Pronadisa, Spain*) yang mengandung 60 ppm *Bromo Cresol Purple* (*Wako, Chemical, Japan*) dan diinkubasi secara anaerob pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

Koloni BAL yang tumbuh pada media MRS Agar diisolasi secara acak dan dimurnikan

dengan cara menggores pada MRS Agar yang mengandung 60 ppm BCP, dan diinkubasi secara anaerob pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni BAL yang terpisah diisolasi dan dikultur pada medium MRS *Broth* dan diinkubasi secara aerob pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya isolat disimpan dalam larutan gliserol 30% pada suhu -20°C sampai dipergunakan untuk penelitian selanjutnya.

Karakteristik Sifat Gram, Katalase dan Tipe Fermentasi

Isolat BAL dikarakterisasi secara morfologi dan fisiologi berdasarkan sifat Gram, produksi gas dari glukosa dan produksi katalase. Hanya isolat Gram positif dan katalase negatif yang diidentifikasi lebih lanjut. Pengujian katalase dilakukan dengan cara meneteskan satu tetes kultur BAL di atas larutan H₂O₂ 30%. Katalase positif ditandai dengan terbentuknya buih (gelembung/buih) (Kozaki *et al.*, 1992). Pengecatan Gram dilakukan untuk melihat morfologi sel dan sifat Gram. Pembentukan gas dari glukosa dilakukan menggunakan *loop* panas dan pembentukan gas ditandai dengan terbentuknya buih (Sperber dan Swan, 1976).

Amplifikasi dan Pembacaan Urutan Nukleotida 16S rDNA

Satu mata ose stok gliserol BAL ditransfer ke dalam 5 mL medium MRS *broth* selanjutnya diinkubasi secara anaerob pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebanyak 2 mL kultur BAL disentrifugasi pada kecepatan 5,000 rpm selama 15 menit pada suhu 5°C. Sel bakteri yang diperoleh dicuci sebanyak dua kali menggunakan air steril, selanjutnya DNA diisolasi dengan mempergunakan *Wizard R Genomic DNA Purification Kit* (*Promega, Singapore*) sesuai prosedur yang direkomendasikan oleh pemasok. Amplifikasi (pencetakan) dilakukan untuk mencetak bagian variabel region I, II, dan III pada 16S rDNA (Mori *et al.*, 1997). Proses reaksi PCR dilakukan pada total volume reaksi 50 µL dengan komposisi: 5 µL dNTPs 2 mM (*Applied Biosystem*); 5 µL 10x PCR Buffer II (Parkin Elmer); 3,5 µL MgCl₂ *solution* 25 mM; 0,25 µL DNA Polymerase 100 U (*Amplitaq Gold 360, Applied Biosystem*); 5 µL Primer 27F (*Promega, Singapore*); 10 pMol (3'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-5'); 5 µL Primer 518R (*Promega, Singapore*); 10 pMol (3'-ACC GCG GC(G/T) GCT GGC-5'); 27,25 µL air bebas ion dan 1 µL DNA. Reaksi diprogram pada kondisi predenaturasi (95°C, tujuh menit) selanjutnya sebanyak 30

siklus pada kondisi: denaturasi (95°C, 20 detik); *annealing* (50°C, 20 detik); *elongation* (72°C, 30 detik) dan terakhir dilanjutkan dengan satu siklus pada suhu 72°C selama lima menit dan tahap akhir PCR adalah pada suhu 4°C. Produk PCR selanjutnya dielektroforesis menggunakan 1,2% *agarose* pada larutan 1x TAE Buffer selama 30 menit/110 volt menggunakan elektroforesis kit (*Applied Biosystem*). Selanjutnya hasil elektroforesis diwarnai menggunakan larutan *etium bromida* (EtBr) dan divisualisasi dengan menggunakan alat *Geldoc* (Enduro GDS, Lab.Net. Int., USA) untuk mengetahui keberhasilan PCR.

Pembacaan susunan nukleotida pada 16S rDNA dilakukan di *Laboratory of Food Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, Japan*. Produk PCR dimurnikan dengan menggunakan PCR SUPREC™ PCR (*Takara Biomedicals, Otsu, Japan*) dan selanjutnya dibaca urutan nukleotidanya dengan menggunakan *BigDye Primer Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit* (*Applied Biosystems*) dengan menggunakan mesin 3100 *Genetic Analyzer* (*PE Applied Biosystems*). Untuk melakukan identifikasi kesamaan susunan nukleotida pada 16S rDNA dilakukan dengan studi homologi BLAST pada *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Ketahanan Isolat Bakteri Asam Laktat pada Deoksi Kolat

Ketahanan isolat BAL pada empedu dilakukan mempergunakan *sodium deoxycholate* (NaDC, SIGMA) pada konsentrasi 0,2-0,6 mM. Isolat BAL ditumbuhkan pada MRS *broth* mengandung NaDC (Sujaya *et al.*, 2008b). Stok beku isolat BAL (Tabel 1) disegarkan dalam MRS *broth* selama 24 jam. Sebanyak 1 mL kultur aktif dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* 2,0 mL dan selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 5,000 rpm selama 15 menit pada suhu 5°C. Supernatan dibuang dan masa sel dicuci dengan menggunakan larutan salin sebanyak dua kali untuk menghilangkan sisa medium. Masa sel yang telah dicuci disuspensikan dalam 1 mL salin dan sebanyak 50 µL diinokulasikan ke dalam 5 mL MRS *broth* mengandung 2 mM, 4 mM dan 6 mM NaDC (SIGMA). Sebagai kontrol, 50 µL suspensi sel isolat BAL diinokulasi ke dalam 5 mL MRS *broth* tanpa NaDC. Media selanjutnya diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C dalam dalam *anaerobic chamber* yang diisi dengan CO₂ *generating gas* (*Mitsubishi gas*). Pertumbuhan

BAL diamati dengan cara mengukur nilai OD_{660nm} dengan menggunakan spektrofotometer (*Genesis 20, Thermo Scientific*). Ketahanan isolat BAL pada berbagai konsentrasi NaDC dinyatakan sebagai penurunan OD_{660nm} dalam persen, yang ditung dari selisih antara perlakuan tanpa pemberian NaDC dengan pemberian NaDC dibagi dengan OD_{660nm} pada perlakuan tanpa pemberian NaDC.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel susu sapi bali yang dianalisis dalam penelitian ini berasal dari tiga ekor sapi bali pada umur laktasi satu minggu, tiga minggu, dan tujuh minggu dengan pertimbangan bahwa masa laktasi yang berbeda memengaruhi komponen nutrisi susu, khususnya oligosakarida (*Tadashu Urashima, Obihiro University, Japan*, komunikasi personal). Oligosakarida yang terkandung dalam susu, memengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dalam saluran pencernaan baik hewan maupun manusia.

Perbedaan konsorsium BAL pada susu sapi bali pada masa laktasi yang berdeda, disajikan pada Gambar 1. Seperti dijelaskan pada bagian materi dan metode, susu diperkaya selama 24 jam dalam media MRS, sehingga BAL yang jumlahnya terbatas dapat membelah diri dan dapat lebih mudah diamati dan diisolasi. Pada Gambar 1 terlihat bahwa semakin lama waktu laktasi terlihat morfologi sel bakteri pada konsorsium BAL semakin beragam. Pada awal masa laktasi, terlihat bentuk kokus mendominasi konsorsium BAL, tetapi setelah minggu ke tiga terlihat adanya sel berbentuk batang yang menggambarkan dinamika pertumbuhan spesies BAL sesuai dengan masa laktasi. Pada penelitian ini diisolasi sebanyak 62 isolat BAL bentuk batang, batang pendek, *cocco bacil* serta bentuk *coccus* dengan karakteristik Gram positif dan katalase negatif (Kozaki *et al.*, 1992; Wood dan Holzaphel, 1995) yang mencakup 61 isolat homofermentatif dan hanya satu isolat heterofermentatif (membentuk gas dari glukosa) (Tabel 1). Identifikasi isolat BAL dengan mempergunakan ciri-ciri morfologi, serta pembentukan gas dari glukosa hanya dapat mengelompokkan BAL sebagai *Lactobacillus* spp. (untuk isolat dengan bentuk batang), *Pediococcus* spp. (untuk isolat dengan bentuk bulat/*coccus*), *Lactococcus/Enterococcus* spp. (untuk isolat dengan bentuk *cocco bacil*). Walaupun identifikasi secara fisiologis

Tabel 1. Bakteri asam laktat isolat susu segar sapi bali

No	Kode	Gram	Katalase	Tipe Fermentasi	16S rDNA	Kemiripan (%)	Kelompok galur [*])
1	BM 2.7	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	97	I
2	BM 2.4	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	98	II
3	BM 2.28	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	98	II
4	BM 50	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	98	II
5	BM 2.2	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
6	BM 101	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
7	BM 2.6	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
8	BM 2.12	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
9	BM 2.25	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
10	BM 30	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
11	BM 33	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
12	BM 39	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
13	BM 51	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
14	BM 52	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
15	BM 57	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
16	BM 58	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
17	BM 61	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
18	BM 67	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
19	BM 72	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
20	BM 73	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
21	BM 75	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
51	BM 97	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
22	BM 93	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	III
23	BM 31	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
24	BM 32	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
25	BM 36	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
26	BM 38	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
27	BM 2.9	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
28	BM 2.13	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
29	BM 2.15	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
30	BM 2.22	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
31	BM 2.23	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
32	BM 41	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
33	BM 42	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
34	BM 43	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
35	BM 45	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
36	BM 46	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
37	BM 48	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
38	BM 55	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
39	BM 65	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
40	BM 66	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
41	BM 59	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
42	BM 60	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
43	BM 70	positif	negatif	homofermentatif	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	IV
44	BM 86	positif	negatif	homofermentatif	<i>Enterococcus gallinarum</i>	98	I
45	BM 89	positif	negatif	homofermentatif	<i>Enterococcus gallinarum</i>	98	I
46	BM 91	positif	negatif	homofermentatif	<i>Enterococcus gallinarum</i>	98	I
47	BM 2.19	positif	negatif	homofermentatif	<i>Enterococcus gallinarum</i>	98	I
48	BM 83	positif	negatif	homofermentatif	<i>Enterococcus gallinarum</i>	99	II
49	BM 92	positif	negatif	homofermentatif	<i>Enterococcus gallinarum</i>	99	II
50	BM 95	positif	negatif	homofermentatif	<i>Enterococcus gallinarum</i>	99	II
52	BM 100	positif	negatif	homofermentatif	<i>Enterococcus gallinarum</i>	99	II
53	BM 2.17	positif	negatif	homofermentatif	<i>Enterococcus gallinarum</i>	99	II
54	BM 2.3	positif	negatif	homofermentatif	<i>Enterococcus gallinarum</i>	99	II
55	BM 63	positif	negatif	homofermentatif	<i>Enterococcus gallinarum</i>	99	II
56	BM 34	positif	negatif	homofermentatif	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	I
57	BM 77	positif	negatif	homofermentatif	<i>Lactococcus garvieae</i>	98	I
58	BM 2.5	positif	negatif	homofermentatif	<i>Lactococcus garvieae</i>	99	II
59	BM 2.14	positif	negatif	homofermentatif	<i>Lactococcus garvieae</i>	100	III
60	BM 2.1	positif	negatif	homofermentatif	<i>Lactococcus garvieae</i>	100	III
61	BM 2.20	positif	negatif	homofermentatif	<i>Lactococcus garvieae</i>	100	III
62	BM 71	positif	negatif	heterofermentatif	<i>Weisella confusa</i>	99	I

(*)Kelompok galur: berdasarkan persen kemiripan dari susunan 16S rDNA parsial.

menggunakan berbagai jenis karbohidrat, suhu pertumbuhan, pH pertumbuhan, kadar garam optimal pertumbuhan dapat dilakukan, tetapi sifat-sifat fisiologis ini sering bervariasi antar isolat dan dilaporkan sangat mudah mengalami perubahan sehingga menyebabkan kesalahan dalam mengidentifikasi BAL. Pada penelitian ini identifikasi dilakukan dengan membaca susunan basa-basa nukleotida pada 16S rDNA yang mempunyai susunan basa nukleotida yang bervariasi dan berbeda pada seluruh spesies prokaryot (Neef *et al.*, 1990). Dengan adanya bagian yang mengandung susunan yang bervariasi (*variable*) dan susunan yang sama (*conserve*) memungkinkan untuk melakukan penjarangan (*alignment*) beberapa urutan basa nukleotida yang dapat menunjukkan perbedaan antar spesies seperti yang dilaporkan oleh Mori *et al.*, 1997. Dalam penelitian ini dilakukan pembacaan urutan basa nukleotida pada basa posisi no 1-500bp (dibaca dari terminal 5 molekul 16S rDNA). Bagian ini mencakup *variable region* I, II, dan III (V1, V2, dan V3) pada 16S rDNA yang merupakan bagian yang mengandung susunan nukleotida yang paling bervariasi pada seluruh spesies prokaryot yang diketahui saat ini (Neef *et al.*, 1990). Dengan demikian perbedaan atau kesamaan urutan nukleotida pada bagian ini akan lebih mendekati spesies BAL yang diidentifikasi.

Hasil pembacaan susunan nukleotida yang dilakukan menunjukkan bahwa dari 62 isolat BAL yang diisolasi dari susu sapi bali, 44 isolat menunjukkan hubungan sangat dekat dengan *Pediococcus acidilactici*, 11 isolat menunjukkan hubungan sangat dekat dengan *Enterococcus gallinarum*, lima isolat menunjukkan hubungan sangat dekat dengan *Lactococcus garvieae*, satu isolat masing-masing menunjukkan hubungan sangat dekat dengan *Lactobacillus plantarum*

dan *Weissella confusa* (Tabel 1). Hasil studi homologi (BLAST pada *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)) menunjukkan variasi susunan nukleotida pada spesies yang sama berkisar dari 97-100%. Isolat yang mempunyai homologi sebesar 99-100% menunjukkan spesies yang sama, sementara isolat dengan homologi sebesar 97% umumnya diduga sebagai spesies yang berbeda (Niamsup *et al.*, 2003). Pada Tabel 1 dan 2 terlihat bahwa *P. acidilactici* dapat digolongkan menjadi empat kelompok genetik berdasarkan kesamaan susunan basa nukleotida yang mempunyai homologi 100% (21 isolat); 99% (19 isolat); 98% (tiga isolat), dan 97% (satu isolat). Sebanyak 11 isolat *E. gallinarum* terdiri dari dua kelompok genetik dengan homologi 99% (tujuh isolat) dan 98% (empat isolat). Sementara *Lac. garvieae* (lima isolats) terdiri dari tiga kelompok genetik dengan homologi 100% (tiga isolat), 99%, dan 98% masing-masing satu isolat. Heterofermentatif BAL, *W. confusa* dan homofermentatif *Lactobacillus*, *Lb. plantarum* hanya ditemukan masing masing satu isolat dengan homologi 99%. Perbedaan susunan basa nukleotida dipakai untuk membedakan isolat pada spesies yang sama dalam penelitian ini secara tentatif dianggap sebagai tipe genetik (Tabel 2), walaupun dalam hal ini masih diperlukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan metode yang lebih baik seperti *finger printing* gen genom untuk mengetahui secara lebih detail diversitas genetik dari isolat BAL susu sapi bali.

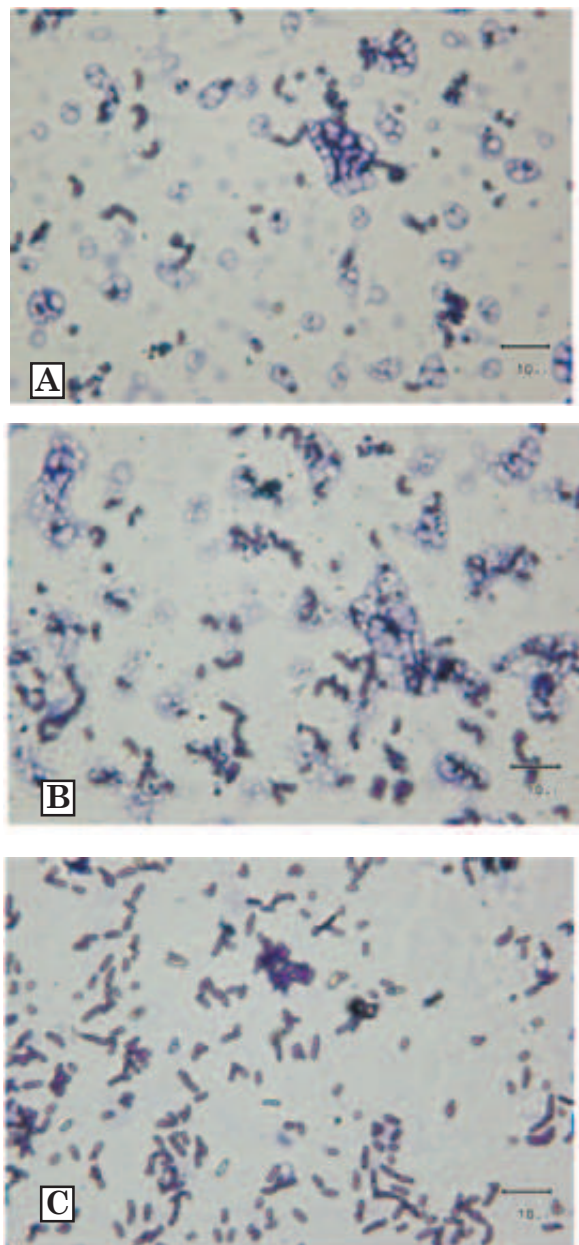
Spesies BAL yang mempunyai hubungan kekerabatan paling dekat pada susu sapi bali sebagian sesuai dengan BAL yang ada pada susu segar lainnya seperti yang telah dilaporkan oleh para peneliti lain sebelumnya. Marion *et al.* (2008) melaporkan bahwa BAL yang diisolasi dari susu sapi segar antara lain *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Lac. lactis* subsp. *cremoris*, *Lac.*

Tabel 2. Galur bakteri asam laktat isolat susu segar sapi bali berdasarkan kemiripan sekuen 16S rDNA parsial.

Spesies	Kemiripan (%)				Jumlah isolat	Jumlah galur
	97	98	99	100		
<i>P. acidilactici</i>	1	3	19	21	44	4
<i>Ent. gallinarum</i>	0	4	7	0	11	2
<i>Lac. garvieae</i>	0	1	1	3	5	3
<i>Lb. plantarum</i>	0	0	1	0	1	1
<i>W. confusa</i>	0	0	1	0	1	1
Jumlah	1	8	29	24	62	

lactis subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. plantarum* dan *Leuconostoc* spp. Lebih jauh ditemukan bahwa *Lac. lactis*, *E. faecalis*, dan *Lb. paracasei* merupakan spesies yang lebih dominan dibandingkan dengan yang lainnya. Penelitian ini menunjukkan hasil yang cukup berbeda dengan apa yang telah dipublikasikan tentang BAL pada susu sapi segar, khususnya dalam jenis/spesies BAL yang ada. Susu segar sapi bali yang dianalisis menunjukkan populasi *P. acidilactici* yang paling dominan sementara *Lactobacillus* merupakan spesies yang jarang ditemukan. Bakteri *P. acidilactici* dilaporkan dapat diisolasi dari susu segar, khususnya susu kambing (Tserovska *et al.*, 2002). Bakteri *P. acidilactici* umumnya diisolasi dari bahan pangan terfermentasi khususnya dari daerah tropis seperti sosis babi ala Bali atau *urutan* (Antara *et al.*, 2001). Dilaporkan juga bahwa *P. acidilactici* dan *P. pentosaceus* diisolasi dari susu kambing terfermentasi dan keju (Tserovska *et al.*, 2002). Keberadaan *P. acidilactici* sebagai isolat dominan pada susu sapi bali belum diketahui secara pasti, namun kemungkinan ada hubungannya dengan suhu daerah tropis di Indonesia. Di negara-negara subtropis, umumnya ditemukan *Lactobacillus* sp., yang kemungkinan berhubungan dengan suhu lingkungan yang berbeda. *P. acidilactici* mempunyai suhu pertumbuhan optimal yang lebih tinggi dibandingkan BAL lainnya, dan bahkan spesies ini tahan pada suhu 45°C (Wood dan Holzappel, 1995).

Susu merupakan habitat yang baik bagi *Lactococcus*. *Lactococcus* khususnya *Lact. lactis* subsp. *lactis* dan *Lac. lactis* subsp. *cremoris* merupakan isolat penting pada pembuatan keju (Salama *et al.*, 1994). Tananam atau hijau (kentang, mentimun, hijau polong) merupakan habitat alami dari *Lac. lactis* dan *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (Salama *et al.*, 1994). *Lactococcus* juga diisolasi dari susu sapi dan kambing segar (Salama *et al.*, 2004). Hasil penelitian menunjukkan bahwa lima isolat *Lac. garvieae* diisolasi dari susu sapi bali segar. Empat isolat di antaranya diisolasi dari susu pada masa laktasi seminggu dan satu isolat diisolasi dari susu masa laktasi tujuh minggu. Dalam penelitian ini, tidak berhasil diisolasi *Lac. lactis* sehingga sepertinya susu sapi bali dihuni oleh isolat spesifik dari *Lac. garvieae*. Dari lima isolat tersebut, ditemukan variasi homologi, satu isolat mempunyai



Gambar 1. Morfologi konsorsium bakteri pada air susu sapi bali yang diperoleh pada masa laktasi yang berbeda dengan pengecatan Gram setelah diperkaya selama 24 jam pada media *Man Regosa and Sharpe* (MRS). A, masa laktasi satu minggu; B, masa laktasi tiga minggu; C, masa laktasi tujuh minggu. Garis skala mewakili ukuran panjang 10 µm. Pembesaran 1000 kali.

kesamaan basa nukleotida 98% dan 99%, sementara tiga isolat mempunyai kesamaan 100% nukleotida. Hal ini menunjukkan bahwa lima isolat *Lac. garvieae* sepertinya terdiri dari

tiga galur (*strain*).

Enterococcus yang diisolasi dari susu segar adalah *E. faecalis* dan *E. faecium* (Guesas dan Kihal, 2004). Namun demikian, pada sapi bali

Tabel 3. Pertumbuhan dan ketahanan bakteri asam laktat isolat susu segar sapi bali pada medium mengandung deoksi kolat

Isolat	Pertumbuhan pada NaDC (OD _{660nm})				Ketahanan pada NaDC (%)				
	0 mM	0,2 mM	0,4 mM	0,6 mM	0 mM	0,2 mM	0,4 mM	0,6 mM	
Grup I	Sangat sensitif								
1	BM 2.4	1,634	1,583	1,074	0,034	100	96,88	65,73	2,08
2	BM 2.12	1,666	1,592	0,891	0,091	100	95,56	53,48	5,46
3	BM 2.13	1,074	0,024	0,018	0,008	100	2,23	1,68	0,74
4	BM 2.14	1,699	1,605	0,551	0,072	100	94,47	32,43	4,24
5	BM 2.19	1,719	1,619	0,068	0,022	100	94,18	3,96	1,28
6	BM 2.17	1,689	1,669	0,511	0,023	100	98,82	30,25	1,36
7	BM 2.23	1,583	1,568	1,168	0,087	100	99,05	73,78	5,50
8	BM 31	1,099	0,234	0,042	0,017	100	21,29	3,82	1,55
9	BM 33	1,868	1,623	1,321	0,037	100	86,88	70,72	1,98
10	BM 36	1,892	1,626	0,742	0,096	100	85,94	39,22	5,07
11	BM 39	1,728	1,674	1,543	0,014	100	96,88	89,29	0,81
12	BM 51	1,776	1,323	0,200	0,007	100	74,49	11,26	0,39
13	BM 59	1,845	1,737	0,515	0,001	100	94,15	27,91	0,05
14	BM 63	1,757	1,480	0,654	0,010	100	84,23	37,22	0,57
15	BM 66	1,677	1,644	1,586	0,033	100	98,03	94,57	1,97
16	BM 70	1,618	1,541	1,400	0,038	100	95,24	86,53	2,35
17	BM 71	1,857	1,696	0,405	0,005	100	91,33	21,81	0,27
18	BM 75	1,515	1,407	0,572	0,049	100	92,87	37,76	3,23
19	BM 83	1,857	1,784	0,427	0,092	100	96,07	22,99	4,95
20	BM 86	1,661	1,587	1,151	0,033	100	95,54	69,30	1,99
21	BM 89	1,862	1,667	0,108	0,094	100	89,53	5,80	5,05
22	BM 91	1,825	1,754	1,472	0,002	100	96,11	80,66	0,11
23	BM 92	1,788	1,720	1,315	0,001	100	96,20	73,55	0,06
24	BM 95	1,650	1,582	1,193	0,001	100	95,88	72,30	0,06
25	BM 97	1,791	1,710	0,840	0,007	100	95,48	46,90	0,39
26	BM 100	1,835	1,682	0,296	0,019	100	91,66	16,13	1,04
	Rataan	1,691	1,505	0,772	0,034	100	86,88	44,96	2,02
Grup II	Sensitif								
1	BM 2.1	1,636	1,446	1,267	0,270	100	88,39	77,44	16,50
2	BM 2.22	1,479	1,417	1,448	0,238	100	95,81	97,90	16,09
3	BM 32	1,877	1,672	1,453	0,209	100	89,08	77,41	11,13
4	BM 34	1,872	1,628	0,674	0,174	100	86,97	36,00	9,29
5	BM 57	1,729	1,681	1,594	0,259	100	97,22	92,19	14,98
6	BM 58	1,859	1,737	1,481	0,195	100	93,44	79,67	10,49
7	BM 60	1,567	1,001	0,952	0,100	100	63,88	60,75	6,38
8	BM 61	1,895	1,628	1,092	0,136	100	85,91	57,63	7,18
9	BM 72	1,664	1,369	1,028	0,145	100	82,27	61,78	8,71
10	BM 73	1,889	1,616	1,411	0,281	100	85,55	74,70	14,88
11	BM 77	1,629	1,578	0,759	0,274	100	96,87	46,59	16,82
12	BM 93	1,596	1,225	1,071	0,118	100	76,75	67,11	7,39
	Rataan	1,724	1,500	1,186	0,200	100	86,84	69,10	11,65

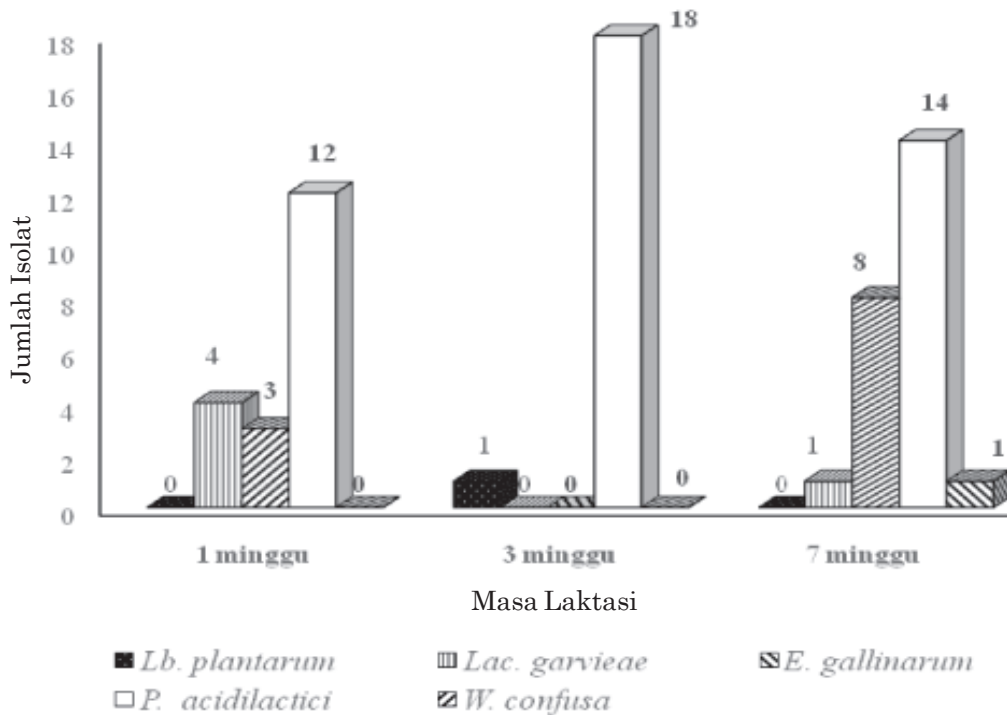
Lanjutan Tabel 3. Pertumbuhan dan ketahanan bakteri asam laktat isolat susu segar sapi bali pada medium mengandung deoksi kolat

Isolat	Pertumbuhan pada NaDC (OD _{660nm})				Ketahanan pada NaDC (%)				
	0 mM	0,2 mM	0,4 mM	0,6 mM	0 mM	0,2 mM	0,4 mM	0,6 mM	
Grup III Tahan									
1	BM 2.2	1,801	1,662	1,504	0,424	100	92,28	83,51	23,54
2	BM 2.3	1,768	1,71	1,512	0,435	100	96,72	85,52	24,60
3	BM 2.5	1,639	1,546	1,484	0,317	100	94,33	90,54	19,34
4	BM 2.6	1,665	1,554	1,531	0,473	100	93,33	91,95	28,41
5	BM 2.7	1,761	1,659	1,475	0,432	100	94,21	83,76	24,53
6	BM 2.9	1,764	1,652	1,594	0,432	100	93,65	90,36	24,49
7	BM 2.15	1,737	1,652	1,575	0,42	100	95,11	90,67	24,18
8	BM 2.20	1,604	1,558	0,839	0,317	100	97,13	52,31	19,76
9	BM 2. 25	1,720	1,629	1,375	0,409	100	94,71	79,94	23,78
10	BM 2.28	1,471	1,369	1,341	0,438	100	93,07	91,16	29,78
11	BM 45	1,733	1,645	1,671	0,495	100	94,92	96,42	28,56
12	BM 46	1,739	1,638	1,567	0,407	100	94,19	90,11	23,40
13	BM 50	1,782	1,633	1,292	0,317	100	91,64	72,50	17,79
14	BM 55	1,646	1,622	1,561	0,308	100	98,54	94,84	18,71
15	BM 65	1,823	1,618	1,354	0,302	100	88,75	74,27	16,57
16	BM 67	1,824	1,762	1,491	0,37	100	96,60	81,74	20,29
	Rataan	1,717	1,619	1,448	0,394	100	94,32	84,35	22,98
Grup IV Sangat tahan									
1	BM 30	1,651	1,643	1,6	0,751	100	99,52	96,91	45,49
2	BM 38	1,687	1,588	1,453	0,597	100	94,13	86,13	35,39
3	BM 41	1,635	1,554	1,253	0,656	100	95,05	76,64	40,12
4	BM 42	1,635	1,354	1,253	0,656	100	82,81	76,64	40,12
5	BM 43	1,558	1,494	1,237	0,785	100	95,89	79,40	50,39
6	BM 48	1,791	1,593	1,438	0,529	100	88,94	80,29	29,54
7	BM 52	1,611	1,652	1,633	0,703	100	102,55	101,37	43,64
8	BM 101	1,835	1,603	1,478	1,270	100	87,36	80,54	69,21
	Rataan	1,675	1,560	1,418	0,743	100	93,28	84,74	44,24

diisolasi 11 isolat *E. gallinarum*. Dari hasil studi homologi diduga bahwa *E. gallinarum* merupakan galur (*strain*) tunggal dilihat dari kesamaan susunan basa nukleotida (semua isolat *Enterococcus* menunjukkan homologi 99%). Bakteri *E. gallinarum* dilaporkan dapat diisolasi dari tanaman sehingga isolat ini kemungkinan berasal dari pakan hijau yang diberikan pada sapi bali. *Lactobacillus plantarum* dan *W. confusa*, juga diisolasi dari susu sapi bali. Namun, BAL tersebut sepertinya merupakan spesies dengan populasi yang terbatas pada susu segar sapi bali, walaupun dalam susu terfermentasi lainnya spesies ini dapat mendominasi populasi BAL lainnya.

Secara umum terlihat bahwa jumlah spesies BAL yang diisolasi dari susu sapi bali segar cukup bervariasi seiring dengan masa laktasi

(Gambar 1 dan 2). Terlihat bahwa spesies yang berhasil diisolasi terbatas pada empat spesies walaupun kemunculan dari masing-masing spesies pada masa laktasi belum dapat disimpulkan secara pasti mengingat sulitnya memperoleh sampel susu. Tetapi terlihat bahwa *P. acidilactici* secara konsisten ditemukan pada semua masa laktasi (Gambar 2). Keberadaan spesies ini secara konsisten pada susu sapi bali selama masa laktasi diduga terkait dengan hijau sebagai sumber pakan serta suhu yang hangat. Selain masa laktasi, faktor penentu lain yang berkontribusi terhadap keberadaan BAL pada susu segar sapi bali adalah kebersihan kandang ternak termasuk potensi cemaran yang ada pada ambung sapi yang sedang menyusui. Spesies BAL yang secara alamiah hidup di lingkungan sekitar kandang, pakan, dan bahkan



Gambar 2. Kemunculan spesies bakteri asam laktat pada susu segar sapi bali pada masa laktasi yang berbeda.

BAL pada mulut anak sapi yang menyusui mempunyai kontribusi pada keragaman BAL pada susu sapi bali.

Ketahanan Bakteri Asam Laktat Isolat Susu Sapi Bali pada Deoksi Kolat

Manfaat kesehatan yang ditimbulkan oleh beberapa isolat BAL seperti probiotik yang sudah teruji seperti *Lactobacillus* GG, *Lactobacillus casei strain Shirota*, *Lactobacillus fermentum* GR1 serta probiotik lainnya, secara dramatis mendorong pengembangan BAL dalam dunia kesehatan. Beberapa manfaat kesehatan BAL telah banyak diklaim baik pada saluran pencernaan (diare, kanker kolon, imunitas) dan saluran kencing (Reid *et al.*, 2003; 1998; 1995) maka penelitian pengembangan BAL untuk tujuan kesehatan seperti pengembangan probiotik BAL dan pangan fungsional berbasis BAL semakin diminati belakangan ini. Untuk tujuan pengembangan probiotik lokal Indonesia, diperlukan persyaratan tertentu (FAO/WHO, 2002; Klaenhammer dan Kullen, 1999) yang salah satu syarat tersebut adalah ketahanan BAL pada kondisi saluran pencernaan manusia. Strain probiotik BAL harus mampu bertahan hidup dalam saluran pencernaan manusia dan berkembang biak pada bagian saluran pencer-

naan. Sehingga strain BAL harus mampu bertahan dan berkompetisi dengan bakteri lainnya, khususnya yang merugikan kesehatan. Karena lingkungan pertumbuhan di mana BAL diaplikasikan berbeda dengan lingkungan habitat asal dari mana BAL tersebut diisolasi, dalam hal ini adalah susu sapi bali, maka dalam upaya pengembangan BAL susu sapi bali paling tidak mesti resisten terhadap empedu, deoksi kolat (dalam hal ini dipergunakan NaDC), yang merupakan komponen empedu utama dalam saluran pencernaan dan mempunyai efek sangat toksik bagi mikroorganisme. Sifat toksik NaDC pada mikroorganisme terkait kerusakan membran sel atau asimilasi empedu ke dalam sel yang dapat mengganggu sistem transpot pada mikroorganisme (Kurdi *et al.*, 2000: 2003). Hasil penelitian menunjukkan bahwa BAL yang diisolasi dari susu sapi bali mempunyai ketahanan yang bervariasi terhadap NaDC. Dengan pertimbangan isolat dianggap tumbuh dengan penampakan kekeruhan medium yang dapat dilihat dengan jelas, maka pertumbuhan positif apabila nilai OD_{660nm} lebih besar atau sama dengan 0,1 setelah BAL dinkubasi selama 48 jam pada suhu pertumbuhan $37^{\circ}C$. Berdasarkan nilai OD_{660nm} ini, maka BAL susu sapi bali dalam penelitian dapat dikelompokkan menjadi empat kelompok yaitu sangat sensitif,

sensitif, tahan, dan sangat tahan terhadap NaDC. Apabila isolat mempunyai nilai OD_{660nm} kurang dari 0,1 dianggap tidak tumbuh (sangat sensitif terhadap NaDC); isolat dengan OD_{660nm} 0,1-0,3 dianggap sensitif terhadap NaDC; isolat dengan nilai OD_{660nm} 0,3-0,5 dianggap tahan, dan apabila isolat mempunyai OD_{660nm} lebih dari 0,5 dianggap sangat tahan terhadap NaDC (Tabel 2). Walaupun ketahanan isolat BAL bersifat individual dan tergantung pada karakteristik individu isolat, secara umum dapat dilihat bahwa beberapa isolat mempunyai kemampuan tumbuh dan ketahanan yang sangat baik terhadap NaDC. Ketahanan dan pertumbuhan BAL susu sapi bali semakin menurun seiring peningkatan konsentrasi NaDC. Namun, hal yang sangat menarik adalah ada beberapa isolat yang tahan dan mampu tumbuh pada konsentrasi NaDC 0,6 mM. Kebanyakan isolat tersebut adalah *P. acidilactici*, yang mempunyai sel berbentuk kokus umumnya lebih tahan pada kondisi yang lebih ekstrim dibandingkan *Lactobacillus*. Berdasarkan sifat tersebut, maka beberapa isolat BAL isolat susu sapi bali perlu diteliti lebih lanjut potensinya sebagai probiotik.

SIMPULAN

Susu sapi bali mengandung BAL yang berbeda dengan susu sapi yang umumnya diketahui. Sebanyak 62 isolat BAL diisolasi dari susu segar sapi bali dan secara genetik mempunyai hubungan sangat erat dengan *P. acidilactici*, *E. gallinarum*, *Lac. garvieae*, *Lb. plantarum*, dan *W. confusa*.

Komposisi BAL pada susu sapi bali unik dan berbeda dengan BAL yang umumnya diisolasi dari susu segar lainnya, dan *P. acidilactici*, *Lac. garvieae*, dan *E. gallinarum* merupakan spesies dominan. Beberapa isolat BAL yang diisolasi dari susu sapi bali mempunyai ketahanan yang baik pada sodium deoksi kolat sehingga berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut menjadi probiotik.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dari aspek sistematika khususnya pada isolat yang mempunyai homologi 98 dan 97%, karena BAL tersebut kemungkinan dari spesies atau sub-spesies baru. Dari aspek pengembangan sumber daya genetik, khususnya mikrob dari sumber

daya alam asli Indonesia, perlu dilakukan eksplorasi tentang potensi bioteknologinya di masa yang akan datang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada peternak yang telah memberikan izin untuk mengambil susu sapi bali dalam penelitian ini, Dr. Drh. Made Subrata yang dengan tekun terlibat dalam pengambilan sampel serta *Department of Animal and Food Hygiene and Department of Food Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan*, atas penggunaan fasilitas selama penelitian ini dilakukan. Penelitian ini dilakukan atas kerja sama UPT Lab. Terpadu Biosain dan Bioteknologi, Unud dengan *Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan*.

DAFTAR PUSTAKA

- Antara NS, Sujaya IN, Yokota A, Asano K, Aryanta WR, Tomita F. 2002. Identification and succession of lactic acid bacteria during fermentation of "urutan", a Balinese indigenous fermented sausage. *World J Microbiol Biotechnol* 18: 255-262.
- Aziz T, Khan H, Bakhthair SM, Naurin M. 2009. Incidence and relative abundance of lactic acid bacteria in raw milk of buffalo, cow and sheep. *J Animal Plant Sci* 9(4): 168-173.
- Boukhemis M, Djeghri-Hocine B, Tahar A, Amrane A. 2009. Phenotypic characterization of *Lactobacillus* isolate isolated from different biotopes. *A J Biotechnol* 8(19): 5011-5020.
- Carr FJ, Hill D, Maida N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol* 28: 281-370.
- Cheriguene A, Chougrani F, Bekada AMA, El Soda M, Bensoltane A. 2007. Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goats' milk. *African J Biotechnol* 6(15): 1854-1861.
- Elgadi ZAM, Gadir WSA, Dirar HA. 2008. Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeast from raw milk in

- Khartoum State (Sudan). *Res J Microbiol* 3(3): 163-168.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada.
- Francois ZN, Victor SD, Florance FA, Paul MF, Felicite TM, El Soda M. 2008. Phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from cow. *Biosci Biotechnol Biochem* 74(3): 484-487.
- Guessas B, Kihal M. 2004. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goat's milk. *AJ Biotechnol* 3(6): 339-342.
- Hagi T, Kobayashi M, Nomura M. 2010. Molecular-based analysis of changes in indigenous microflora during the grazing period. *Biosci Biotechnol Biochem* 74(3): 484-487.
- Klaenhammer TR, Kullen MJ. 1999. Selection and design of probiotics. *Int J Food Microbiol* 50: 45-57.
- Kozaki M, Uchimura Y, Okada S. 1992. *Manual for isolation and identification of lactic acid bacteria*. Tokyo. Asakura Shoten.
- Kurdi P, Tanaka H, van Veen H, Asano K, Tomita F, Yokota A. 2003. Cholic acid accumulation and its diminution by short chain fatty acids in bifidobacteria. *Microbiol* 149: 2031-2037.
- Kurdi P, van Veen H, Tanaka H, Mierau I, Konings WN, Tannock GW, Tomita F, Yokota A. 2000. Cholic acid is accumulated spontaneously, driven by membrane Δ pH, in many lactobacilli. *J Bacteriol* 182: 6525-6528.
- Liu SQ. 2003. Review article: Practical implication of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int J Food Microbiol* 83:115-131.
- Marion D, Sylvie P, Veronique R, Yann D. 2008. Evolution of the raw cow milk microflora, especially Lactococci, Enterococci, Leuconostocs and Lactobacilli over a successive 12 day milking regime. *Int J Dairy Sci* 3(3): 117-130.
- Martojo H. Indigenous Bali cattle: the best suited breed for sustainable small farms in Indonesia. www.google.com (last opened: Maret 2011).
- Mori K, Yamazaki K, Ishiyama T, Katsumata M, Kobayashi K, Wiwai Y, Inoue N, Shinano H. 1997. Comparative sequence analyses of the gene coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. *Int J Syst Bacteriol* 47: 54-57.
- Neef JM, van de Peer Y, Hendriks L, Watcher DR. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nuc Acid Res* 18: 2237-2317.
- Niamsup P, Sujaya IN, Tanaka M, Sone T, Hanada S, Kamagata Y, Lumyong S, Assavanig A, Asano K, Tomita F, Yokota A. 2003. *Lactobacillus thermotolerans* sp. Nov., a novel thermotolerant species isolated from chicken faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 263-268.
- Ouweland AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. 1999. Probiotics: mechanism and established effects. *Int Dairy J* 9: 43-52.
- Park YW, Ju'arez M, Ramos M, Haenlein GFW. 2007. Physicochemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin Res* 68: 88-113.
- Reid G, Bruce AW, Smeianov V. 1998. The role of lactobacilli in preventing urogenital and intestinal infections. *Int Dairy J* 8: 555-562.
- Reid G, Bruce AW, Taylor M. 1995. Instillation of *Lactobacillus* and stimulation of indigenous organisms to prevent recurrence of urinary tract infections. *Microecol Ther* 23: 32-45.
- Reid G, Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beuerman D, Poehner R, Bruce AW. 2003. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol* 35: 131-134.
- Salama MS, Musafija-Jeknic T, Sandine WE, Givannoni S. 1994. An ecological study of lactic acid bacteria: Isolation of new isolates of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subspecies cremoris. *J Dairy Sci* 78: 1004-1017.

- Sperberg WH, Swan J. 1976. Hot-loop test for the determination of carbon dioxide production from glucose by lactic acid bacteria. *Appl Env Microbiol* 31: 990-991.
- Suardana IW, Suarsana IN, Sujaya IN, Wiryawan KG. 2007. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari cairan rumen sapi bali sebagai kandidat biopreservatif. *J Veteriner* 8(4): 155-159.
- Sujaya IN, Amachi S, Yokota A, Asano K, Tomita F. 2000. Identification and characterization of lactic acid bacteria in ragi tape. *World J Microbiol Biotechnol* 17: 349-357.
- Sujaya IN, Ramona Y, Widarini NP, Suariani NP, Dwipayanti NMU, Nocianitri KA, Nursini NW. 2008a. Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari susu kuda sumbawa. *J Veteriner* 9(1): 52-59.
- Sujaya IN, Dwipayanti NMU, Suariani NLP, Widarini NP, Nocianitri KA, Nursini NW. 2008b. Potensi *Lactobacillus* spp isolat susu kuda sumbawa sebagai probiotik. *J Veteriner* 9(2): 33-40.
- Tserovska L, Stefanova S, Yordanova T. 2002. Identification of lactic acid bacteria isolated from kатыk, goat's milk and cheese. *J Culture Collect* 3: 48-52.
- Wood BJB, Holzapfel WH. 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Volume 2. Tokyo. Blackie Academic and Professional.
- Zhu X, Yang Z, Gu R, Sun Y, Lu M, Zhang Y, Wang H. 2009. Screening of lactic acid bacteria isolated with potential probiotic properties of cholesterol lowering from Chinese traditional fermented dairy products. *Res J Dairy Sci* 3: 25-31.