

Potensi *Lactobacillus* spp. Isolat Susu Kuda Sumbawa sebagai Probiotik

(PROBIOTIC POTENCY OF *LACTOBACILLUS* SPP. ISOLATED FROM SUMBAWA MARE MILK)

I Nengah Sujaya^{1,2}, Ni Made Utami Dwipayanti¹, Ni Luh Putu Suariani¹,
Ni Putu Widarini¹, Komang Ayu Nocianitri³, Ni Wayan Nursini²

¹Program Studi Ilmu Kesehatan Masyarakat, Universitas Udayana, Gedung BF, Komplek Fakultas Pertanian, Bukit Jimbaran, Badung, Bali, Indonesia, Tel/Fax : 62 361 701 805; Email : inengah_sujaya@yahoo.com

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

³Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Bukit Jimbaran, Badung, Bali, Indonesia, Tel/Fax : 62 361 701 801

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menggali potensi *Lactobacillus* spp. isolat susu kuda sumbawa sebagai probiotik isolat lokal. Sebanyak 16 isolat *Lactobacillus* spp. diseleksi berdasarkan ketahanannya pada kondisi saluran pencernaan dengan mempergunakan model cairan getah lambung dengan pH 2, 3, dan 4 yang dilanjutkan dengan kemampuannya melewati usus kecil dengan kandungan deoksi kolat. Dari 16 isolat *Lactobacillus* yang dipergunakan diperoleh 3 isolat yaitu *Lactobacillus* sp. SKA13, *Lactobacillus rhamnosus* SKG34, dan *L. rhamnosus* SKG49 yang mampu melewati simulasi kondisi lambung dengan pH 3 dan 4. Tidak ditemukan *Lactobacillus* yang mampu bertahan pada kondisi lambung dengan pH 2. Hanya *Lactobacillus rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 yang mampu melewati kondisi usus dengan kandungan 0,4 mM sodium deoksi kolat dan pankreatin sehingga kedua isolat ini mempunyai potensi sebagai galur probiotik. Uji *in vitro* biotransformasi asam kolat menunjukkan bahwa *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 dapat mentransformasi asam kolat menjadi turunan asam kolat. Walaupun merupakan karakter yang kurang menguntungkan bagi strain probiotik, sifat ini sangat menarik untuk diteliti lebih lanjut karena belum pernah dilaporkan pada lactobacilli.

Kata kunci : *Lactobacillus*, susu kuda sumbawa, probiotik.

ABSTRACT

This research was designed to elucidate the potency of *Lactobacillus* spp. isolated from sumbawa mare milk to be developed as a probiotic. Sixteen lactobacilli were screened based on their resitancy to a model of gastric juice at pH 2, 3, and 4, then followed by their resistncy to small intestinal fluid model containing deoxycholic. Three lactobacilli i.e. *Lactobacillus* sp. SKA13, *Lactobacillus rhamnosus* SKG34 and *Lactobacillus rhamnosus* SKG49 were found to be resistant to gastric juice at pH 3 and 4. However, there were no lactobacilli resisted to pH 2. *L. rhamnosus* SKG34 and *L. rhamnosus* SKG49 were able to reach the colon even after being exposed to a model of intestinal fluid containing 0,4 mM deoxycholate and pancreatine. Therefore, these isolates have a potency to be developed as probiotic lactobacilli. Nevertheless, these lactobacilli could probably transform cholic acid into secondary bile acids, which were not expected to be found in the probiotic, and this capability is not appropriate for probiotic. This character is worthy to be studied since it has never been reported in lactobacilli.

Key words: *Lactobacillus*, sumbawa mare milk, probiotic

PENDAHULUAN

Komposisi bakteri saluran pencernaan yang sangat dinamis dipengaruhi oleh bahan pangan serta keadaan emosi dan stress (Holdeman *et al.*, 1976; Mackie *at al.*, 1999, Hooper dan Gordon, 2001). Bakteri saluran pencernaan mempunyai fungsi penting dan berkaitan sangat erat dengan kesehatan manusia, walaupun dari 5% jenis bakteri yang berhasil diisolasi belum sepenuhnya diketahui fungsi, struktur, dan metabolismenya di dalam saluran pencernaan. Bagaimana mempertahankan agar komposisi bakteri saluran pencernaan didominasi oleh bakteri yang menguntungkan dan meminimalkan bakteri yang bersifat putrefaktif (pendegradasi protein) merupakan konsep yang sampai saat ini dipercaya sebagai indikator kesehatan saluran pencernaan (Crittenden, 1999).

Modifikasi komposisi bakteri saluran pencernaan agar didominasi oleh bakteri menguntungkan seperti *Lactobacilli* dan *bifidobacteria* dapat dilakukan melalui konsumsi bakteri hidup yang disebut probiotik (Collins dan Gibson, 1999) dan konsumsi bahan pangan khusus (prebiotik) (Gibson dan Roberfroid, 1995; Roberfroid, 2000). Probiotik didefinisikan sebagai bakteri hidup suplemen bahan makanan yang memberikan efek menguntungkan bagi manusia dengan menjaga keseimbangan bakteri yang menguntungkan di dalam saluran pencernaan (Fuller, 1989). Belakangan ini, probiotik berkembang makin pesat sejalan dengan makin banyaknya penyakit yang berhubungan dengan terganggunya komposisi bakteri saluran pencernaan sehingga probiotik menjadi salah satu pilihan terapi, seperti untuk mengobati alergi (Isolauri *et al.*, 2002; Kalliomaki *et al.*, 2004), diare (van Neil *et al.*, 2002) dan sebagainya. Probiotik bakteri yang beredar di pasaran umumnya dikembangkan dari golongan bakteri asam laktat (*Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*) dengan tujuan penggunaannya yang berbeda. Secara umum, probiotik antara lain digunakan 1) untuk mencegah diare: *Lactobacillus acidophilus* dikombinasikan dengan *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Enterococcus faecium* SF68i dan *Bifidobacterium longum*, *Saccharomyces boulardi*; 2) untuk Gastroenteritis akut: *Lb. rhamnosus* GG, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei* strain Shirota, *E. faecium* SF68 dan *Sacc. boulardi*; 3) *Traveller's*

diarrhoea: *L. acidophilus*, *L. acidophilus* dikombinasikan dengan *L. bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum* strain KLD, *L. rhamnosus* GG dan *Sacc. boulardi* (Marteau *et al.*, 2001). Dengan tujuan pemanfaatan yang khas memicu pencarian sumber-sumber bakteri asam laktat untuk pengembangan probiotik baru.

Susu kuda sumbawa merupakan susu hasil pemerahan kuda yang dilepas di padang rumput di Nusa Tenggara Barat, khususnya di Kabupaten Dompu, Bima, dan Sumbawa, yang dipasarkan beredar dengan nama "susu kuda liar". Beberapa efek kesehatan yang diklaim bisa diperoleh dari meminum susu kuda sumbawa adalah penyembuhan bronchitis, paru paru basah, tifus, menurunkan kolesterol, dan hipertensi. Susu kuda sumbawa dapat menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* (Rijatmoko, 2003) dan mempunyai spektrum penghambatan yang luas terhadap bakteri patogen perusak bahan pangan (Hermawati *et al.*, 2004). Namun, penghambatan yang telah didemonstrasikan terhadap beberapa bakteri patogen dan penyebab keracunan bahan pangan diberikan oleh bahan aktif yang sudah berhasil diekstrak dari susu kuda sumbawa (Hermawati *et al.*, 2004).

Susu kuda sumbawa merupakan medium yang baik untuk pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) endogen karena kandungan nutrisinya yang baik. Keberadaan BAL dan atau aktivitas metaboliknya pada susu kuda sumbawa diyakini berkontribusi positif terhadap dampak penyehatan yang ditimbulkan melalui konsumsi susu kuda sumbawa. Namun, terbatasnya penelitian yang telah dilakukan dan dipublikasikan menyebabkan BAL yang secara alami tumbuh pada susu kuda sumbawa serta potensinya belum dapat dimanfaatkan secara maksimal. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa beberapa strain *Lactobacillus* spp. telah diisolasi dan sebanyak 24 isolat *Lactobacillus* spp. dapat menghambat beberapa bakteri patogen seperti *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, dan *Shigella flexi+neri* sehingga isolat ini kemungkinan dapat dikembangkan sebagai agensia probiotik (Data belum dipublikasi). Penapisan yang telah dilakukan terbatas pada kemampuan *Lactobacillus* spp. isolat susu kuda sumbawa untuk menghambat patogen, karakteristik massa sel, dan identifikasi isolat potensial yang merupakan persyaratan awal dalam pengembangan probiotik BAL. Dua isolat

potensial telah diidentifikasi sebagai *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49. Untuk dapat menggali potensi BAL isolat susu kuda sumbawa sebagai kandidat galur probiotik, diperlukan penelitian untuk mengetahui kemampuan isolat potensial tersebut bertahan dalam kondisi saluran pencernaan manusia.

METODE PENELITIAN

Strain dan Pemupukan

Strain *Lactobacillus* yang dipergunakan dalam penelitian ini (Tabel 1) diperoleh dari UPT Laboratorium Terpadu Biosain dan Bioteknologi, Universitas Udayana.

Stok *Lactobacillus* spp. dalam gliserol yang disimpan dalam freezer -20°C ditransfer ke dalam MRS broth (*de Man Rogosa Sharpe broth*, Pronadisa), yang mengandung 20g/l *dextrosa*, 10g/l pepton, 8g/l *beef extract*, 5g/l *Na-acetate*, 4g/l *yeast extract*, 2g/l *dipotassium phosphate*, 1g/l *tween 80*, 2g/l *diamonium citrate*, 0,2g/l *magnesium sulphate*, dan 0,05g/l *manganese sulphate*, dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dalam keadaan anaerob menggunakan *anaerobic gas pouch* (BBL). Selanjutnya dilakukan pemurnian dengan menggores kembali (*re-streaking*) pada medium MRS agar untuk mendapatkan koloni tunggal (*single colony isolation*) yang selanjutnya dipergunakan dalam penelitian ini.

Karakterisasi Probiotik

Isolat diuji ketahanannya pada kondisi saluran pencernaan dengan kondisi yang berbeda seperti kondisi lambung dengan pH yang rendah dan enzim pepsin, usus kecil dan kolon dengan pankreatin dan asam empedu yang tinggi.

Ketahanan pada Saluran Pencernaan Bagian Atas

Sebanyak 1 ml dari kultur aktif sel *Lactobacillus* spp. yang telah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dalam keadaan anaerob, dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* dan disentrifuse pada kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit pada suhu 5°C . Massa sel dicuci dengan menggunakan 500 μl larutan saline. Sebanyak 50 ml suspensi sel dimasukkan ke tabung *ependorf* yang telah diisi 1.000 μl larutan simulasi cairan lambung mengandung 125 mM NaCl; 7 mM KCl; 45 mM NaHCO_3 ; dan pepsin 0,1% (Charteris *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 2003) yang pH-nya telah diatur dengan HCl mendekati pH: 2, 3, dan 4. Tabung yang berisi

sediaan sel diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam. Sebanyak 100 μl dari suspensi sel diambil dan diencerkan 10 kali dan 50 μl ditranfer ke dalam 5 ml MRS broth pH netral dan diinkubasi pada keadaan anaerob pada suhu 37°C selama 48 jam. Adanya pertumbuhan diukur dengan mengukur kekeruhan pada panjang gelombang 660 nm (*optical density* 660 (OD_{660})) dengan menggunakan spektrofotometer (Genesis).

Untuk melihat ketahanan strain BAL lebih lanjut sebelum memasuki kolon maka sebanyak 800 μl dari cuplikan sampel di atas disentrifuse dan dicuci sebanyak dua kali dengan menggunakan larutan garam fisiologis (*saline*) untuk menghilangkan pengaruh pH rendah sebelumnya. Massa sel yang diperoleh disuspensikan ke dalam 500 μl model cairan lambung dengan komposisi kimia seperti di atas yang mengandung 0,1% pankreatin dan 0,2 mM natrium deoksi kolat (NaDC) dengan pH 8. Suspensi diinkubasi sambil digoyang dengan kecepatan 120 rpm selama 4 jam. Sebanyak 100 μl dari suspensi sel diambil dan diencerkan 10 kali dan selanjutnya 50 μl ditransfer ke dalam 5 ml MRS broth pH netral. Medium diinkubasi seperti prosedur di atas dan selanjutnya pertumbuhan sel dianalisis dengan mengukur kekeruhan pada panjang gelombang 660 nm (OD_{660}).

Isolat BAL yang mampu melewati kondisi lambung selama 3 jam dan melewati kondisi usus selama 4 jam, selanjutnya dianalisis untuk menentukan besarnya populasi yang diperkirakan dapat mencapai usus besar atau saluran pencernaan bagian bawah.

Penentuan Derivat Asam Kolat

Biotransformasi asam kolat dilakukan dengan menggunakan 5 ml MRS broth pH 7.0 dan ditambahkan 25 mM asam kolat (*cholic acid*, SIGMA) dan diinkubasi selama 48 jam dalam keadaan anaerob menggunakan *anaeropack* (*Mitsubishi gas*) (Kurdi *et al.* 2000; Yoshida, 2004). Sebanyak 1 ml dari kultur diambil kemudian disentrifuse 5.000 rpm selama 10 menit, selanjutnya 100 μl dari supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung *ependofit*, dan ditambahkan 10-20 μl larutan HCl 3 N, dan 0.5 ml etil asetat, divorteks selama 1 menit selanjutnya di-sonikasi selama 10 menit. Suspensi disentrifuse selama 5 menit pada 5,000 rpm. Bagian lapisan etil asetat diambil dan langkah ekstraksi diulangi sekali lagi. Gabungan supernatan (bagian etil asetat) yang diperoleh selanjutnya diuapkan pada suhu

kamar selama semalam atau bisa dilakukan menggunakan *evaporator* atau blok pemanas (*heating block*). Asam kolat sekunder yang terbentuk dari hasil biotransformasi oleh BAL diamati dengan menggunakan *thin layer chromatography* (silica gel TLC, Emerck No.1.05553), dengan *eluent cyclohexane*, etil asetat, dan asam asetat dengan perbandingan volume 10:15:14. Setelah elusi hasil biotransformasi dideteksi dengan menggunakan *molibdoposporic acid* (10% dalam etanol 99,9%), dan spot akan tampak setelah dipanaskan di dalam oven selama 1-2 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ketahanan pada Kondisi Saluran Pencernaan Bagian Atas

Dari 16 isolat *Lactobacillus* spp. yang diseleksi, ditemukan hanya 3 isolat *Lactobacillus* spp. yang mampu tumbuh pada MRS broth pH netral setelah direndam dalam model cairan lambung dan usus pH 2, 3 dan 4 (Tabel 1). Hasil seleksi ini menunjukkan bahwa *Lactobacillus* sp. SKA13 hanya mampu melewati kondisi lambung pada pH 3 dan pH 4. Selanjutnya sel yang telah mengalami *injury* lebih mudah mati dalam lingkungan usus dengan DCA dan pankreatin sehingga setelah 4 jam dipaparkan pada kondisi ini tidak ditemukan pertumbuhan *Lactobacillus* sp. SKA13 pada MRS broth. Hasil uji *in vitro* ini menunjukkan bahwa *Lactobacillus* sp. SKA13 diduga tidak mampu mencapai kolon dalam keadaan hidup. Di lain pihak, *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49, menunjukkan pertumbuhan yang baik pada model getah lambung pH 3 dan 4 serta setelah sel secara kontinu dipaparkan pada kondisi cairan usus. Hal ini menunjukkan bahwa *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 secara *in vitro* kemungkinan besar mampu mencapai kolon dalam keadaan hidup. Dengan berpegang pada definisi probiotik adalah bakteri hidup yang mampu bertahan dalam saluran pencernaan maka *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai galur probiotik. Namun, pada seleksi probiotik perkiraan jumlah populasi minimum yang memadai untuk dikonsumsi sehingga mampu mencapai lokasi target pada jumlah sel tertentu sangat diperlukan agar harapan terhadap efek menyehatkan dapat dicapai. Dengan demikian, diperlukan analisis kuantitatif jumlah sel pada saat melewati lambung dan pada saat masuk

ke dalam usus besar (Annuk *et al.* 2003).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah sel *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 mengalami penurunan di dalam saluran pencernaan (Gambar 1). Sebelum sel diperlakukan dengan simulasi cairan lambung dengan pepsin, jumlah sel awal pada *L. rhamnosus* SKG34 adalah sebesar $4,3 \times 10^8$ sel/100 μ l dan *L. rhamnosus* SKG49 sebesar $5,2 \times 10^8$ sel/100 μ l. *L. rhamnosus* SKG49 lebih tahan pada kondisi saluran pencernaan dibandingkan dengan *L. rhamnosus* SKG34 dan besarnya populasi akhir yang diperkirakan dapat mencapai saluran pencernaan bagian bawah/usus besar sangat ditentukan oleh pH pada lambung. Setelah melewati simulasi cairan lambung, sel mengalami stress pH dan enzim sehingga lebih peka terhadap keadaan yang tidak menguntungkan di dalam usus dan kolon. Pada kondisi ini adanya pankreatin dan deoksi kolat, yang bersifat sebagai detergen biologis, merusak dinding sel sehingga sel akan mengalami kematian (Gambar 1). *L. rhamnosus* SKG49 lebih tahan kurang lebih 1 log (10x) pada akhir perjalanan saat melewati saluran pencernaan bagian atas selama 7 jam dibandingkan dengan *L. rhamnosus* SKG34, sehingga tampaknya *L. rhamnosus* SKG49 lebih berpotensi dikembangkan lebih lanjut sebagai probiotik.

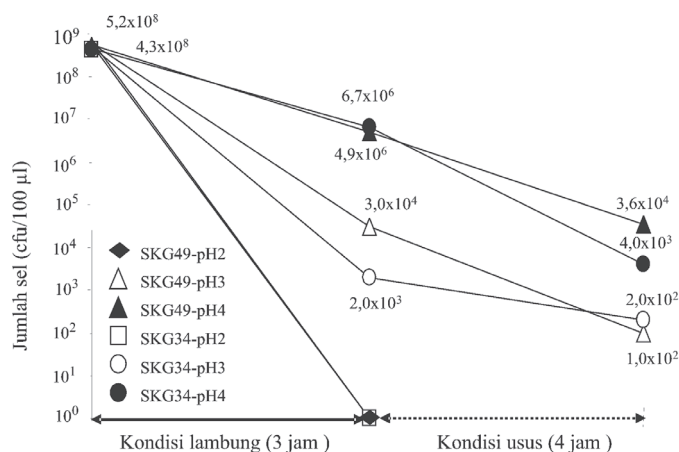
Pembentukan Derivat Asam Kolat (*secondary bile acids*).

Transformasi asam kolat merupakan karakteristik penting dalam seleksi pengembangan probiotik baru. Hal ini karena hasil transformasi dari asam empedu primer khususnya asam kolat (CA) menjadi deoksi asam kolat (DCA) atau asam empedu sekunder lainnya yang diduga sebagai promotor kanker kolon. Dilaporkan bahwa pada individu yang menderita kanker kolon ditemukan kandungan asam empedu sekunder seperti deoksi asam kolat, litho asam kolat, dan sebagainya dalam fesesnya lebih tinggi dibandingkan pada manusia sehat. Tingginya konsentrasi asam empedu sekunder dalam saluran pencernaan disebabkan oleh biotransformasi asam kolat oleh konsorsium bakteri saluran pencernaan, yang sampai saat ini diketahui oleh aktivitas pertumbuhan dari beberapa golongan *Clostridium* (Wells *et al.* 2002, 2003). Oleh karena itu, salah satu tujuan penggunaan probiotik dalam kaitannya dengan penurunan kanker kolon adalah untuk mengurangi populasi *Clostridium* spesies tertentu (*Clostridium scindens* dan *Clostridium*

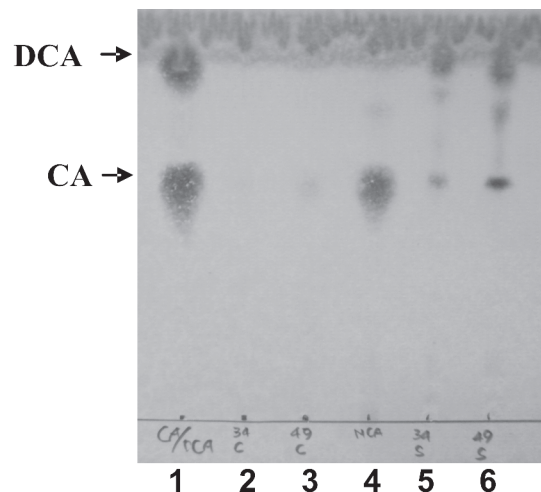
Tabel 1 Ketahanan bakteri asam laktat isolat susu kuda sumbawa terhadap pH, enzim pencernaan

Strain	OD _{660nm} ^(*)					
	3 jam			4 jam		
	pH 2	pH 3	pH 4	pH 2	pH 3	pH 4
<i>Lactobacillus</i> sp. YSK1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lactobacillus</i> sp. YSK2	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lactobacillus</i> sp. YSK3	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lactobacillus</i> sp. YSK4	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lactobacillus</i> sp. YSK7	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lactobacillus</i> sp. YSK1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lactobacillus</i> sp. SKA13	<0.01	0.843	0.779	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lactobacillus</i> sp. SKG5	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lactobacillus</i> sp. SKG7	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lactobacillus</i> sp. SKG9	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lactobacillus</i> sp. SKG10	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lactobacillus</i> sp. SKG11	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lactobacillus</i> sp. SKG12	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lactobacillus</i> sp. SKG13	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lb. rhamnosus</i> SKG34	<0.01	2.012	2.004	<0.01	1.070	2.183
<i>Lactobacillus</i> sp. SKG44	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Lb. rhamnosus</i> SKG49	<0.01	1.535	1.870	<0.01	2.201	2.059

^{*)} OD_{660nm} diukur setelah sel direndam selama 3 jam pada model cairan getah lambung mengandung 0,1% pensin pH 2,3 dan 4 dan dilanjutkan direndam dalam model cairan usus mengandung 0,1% pankreatin dan 0,4 mM deoksi kolat pH 8 selama 4 jam ke dalam MRS broth pH netral. Pertumbuhan dianggap positif apabila nilai OD₆₆₀ ≥ 0.01



Gambar 1. Populasi (cfu/100 µl) dari *Lactobacillus* sp. SKG34 dan *Lactobacillus* sp. SKG49, selama dalam perjalanan pada simulasi kondisi saluran pencernaan. SKG49-2, SKG49-3, SKG49-4: masing masing *Lactobacillus* sp. SKG49 yang diperlukan pada simulasi cairan getah lambung pH 2, 3, dan 4. SKG34-2, SKG34-3, SKG34-4: masing-masing *Lactobacillus* sp. SKG34 yang diperlukan pada simulasi cairan getah lambung pH 2, 3, dan 4. Cara kerja dijelaskan pada bagian Materi dan Metode



Gambar 2. Transformasi Na- kolat oleh *Lactobacillus* sp. SKG34 dan *Lactobacillus* sp. SKG49. 1: CA/DCA: standar Na-deoksi kolat dan Na-kolat; 2: transformasi CA yang diekstraksi dari masa sel SKG34; 3: transformasi CA yang diekstraksi dari masa sel SKG49; 4: transformasi CA yang diekstraksi dari supernatan SKG-34; 5: transformasi CA yang diekstraksi dari supernatan SKG49; 6: CA yang diekstraksi dari medium MRSCA sebelum ditambahkan dengan *Lactobacillus* sp. 34 dan *Lactobacillus* sp. SKG49. Cara kerja dijelaskan pada bagian Materi dan Metode.

hiranonis).

Hasil skrining yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan bahwa sepertinya asam kolat ditransformasi oleh *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 (Gambar 2) yang diindikasikan dengan terbentuknya bercak yang mempunyai *retention time* (Rt) hampir sama dengan standar deoksi kolat. Munculnya bercak pada sampel yang diekstraksi dari supernatan biakan setelah ditumbuhkan dengan *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 sebagai dugaan kuat terjadinya dehidroksilasi atau metabolisme asam kolat. Tetapi, hasil ini masih prematur (*preliminary*) dan memerlukan pengkajian yang lebih mendalam. Pendapat ini berdasarkan pemahaman bahwa sampai saat ini dehidroksilasi asam kolat melibatkan serangkaian gen dalam *bai gene* (*bile inducible gene*) operon (Kinchel *et al.*, 1997) yang dilaporkan ditemukan pada *Cl. scindens*, *Cl. hiranonis* (Kinchel *et al.*, 1997; Kitahara *et al.*, 2000). Kalau terbukti bahwa *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 membawa *bai gene* maka merupakan hal yang sangat baru dalam bidang mikrobiologi karena *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 diisolasi dari susu kuda sumbawa dan bukan

berasal dari saluran pencernaan manusia atau hewan. Hasil ini mengindikasikan bahwa kemungkinan mekanisme dehidroksilasi asam kolat menjadi deoksi kolat oleh *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 berbeda dari *Clostridium* karena secara alamiah tidak ada asam empedu yang menginduksi aktivitas enzim ini pada susu.

Pada umumnya, dehidroksilasi asam kolat oleh bakteri dalam uji *in vitro* dilakukan dalam keadaan strik anaerob serta pada medium dengan buffer sehingga tidak menyebabkan pengendapan asam kolat (Kurdi *et al.*, 2000). Karena pada penelitian ini biotransformasi dilakukan tanpa *buffering agent* sehingga asam kolat mengendap atau diikat oleh muatan negatif (*negative charge*) dinding sel. Oleh karena itu pada penelitian ini kemungkinan itu dikonfirmasi dengan menganalisis endapan asam kolat atau deoksi kolat pada permukaan sel atau karena pengaruh penurunan pH mengingat derajat disosiasi kolat dan deoksi kolat pada pH yang relatif tinggi yaitu pada pH 6,4 untuk asam kolat dan pada pH. 6,58 untuk deoksi kolat (Kurdi *et al.*, 2000). Hasil penelitian menunjukkan bahwa sangat sedikit (dapat diabaikan) asam kolat atau deoksi kolat terdeteksi dalam endapan atau permukaan sel *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 (Gambar 2, C-SKG34 dan C-SKG49) sehingga produk transformasi utama terdeteksi pada supernatan (S-SKG34 dan S-SKG49). Efisiensi *recovery* ekstraksi diamati dengan mengekstrak asam kolat pada medium sebelum diinokulasi dengan *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 sehingga metode ekstraksi dalam penelitian ini mempunyai kemampuan yang baik untuk memisahkan CA dari medium. Oleh karena itu, penelitian ini berpotensi membuka peluang dalam wawasan baru dalam dunia keilmuan khususnya biologi molekuler dan mikrobiologi tentang bagaimana biotransformasi atau dehidroksilasi CA pada keadaan tidak strik anaerob dengan pH tidak terkontrol, terlebih dilakukan oleh BAL yang sampai saat ini mendapat predikat bakteri aman dan bahkan *foodgrade* (kualitas setara bahan pangan).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

L. rhamnosus SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 mempunyai potensi sebagai probiotik dari 16 isolat BAL. Kedua isolat mati kalau terpapar pH 2 selama 3 jam pada simulasi cairan

getah lambung. *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 mengubah asam kolat menjadi metabolit asam lain seperti deoksi kolat.

Saran

Hasil penelitian ini menyarankan perlunya melakukan uji lanjutan guna menggali potensi *L. rhamnosus* SKG34 dan *L. rhamnosus* SKG49 sebagai probiotik seperti kemampuan untuk mengkolonisasi saluran pencernaan pada hewan coba, identifikasi molekuler untuk mengembangkan metode deteksi, serta kemungkinan adanya *bile acid inducible gene* pada kedua isolat BAL tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dirjen DIKTI, Depdiknas, yang telah membiayai sebagian dari penelitian ini melalui Penelitian Dosen Muda dengan kontrak No. 010/SP2H/PP/DP2M/III/2007, serta UPT. Lab. Terpadu Biosain dan Bioteknologi, Unud atas pemanfaatan fasilitas laboratorium selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Annik JS, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M, Mikelsaar M. 2003. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotics candidates. *J Appl Microbiol* 94: 403-412.
- Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. 1998. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 84: 759-768.
- Collins MD, Gibson GR. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 69: 1052S-1057S.
- Crittenden RG. 1999. Prebiotics. In: Tannock, G.W. (Ed). *Probiotics, a Critical Review*. Wymondham England: Horizon Scientific Press. Pp 141-156.
- Fuller R. 1989. A Review: probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66: 365-378.
- Fernandez MF, Boris S, Barbes C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 94:449-455.
- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125: 1401-1412.
- Hermawati D, Sudarwanto M, Soekerto ST, Zakaria FR, Sudardjat S, Tjatur Rasa FS. 2004. Aktivitas antimikroba pada susu kuda sumbawa. *J Teknol Industri Pangan* 15: 47-53.
- Holdeman LV, Good IJ, Moore WEC, 1976. Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl Environ Microbiol* 31: 359-375.
- Hooper LV, Gordon JI. 2001. Commensal host-bacteria relationships in the gut. *Science* .292:1115-1118
- Isolauri E, Rautava S, Kalliomaki M, Kirjavainen P, Salminen S. 2002. Role of probiotics in food hypersensitivity. *Curr Opin. Allergy Clin Immunol* 2:263-267.
- Kalliomaki M, Salminen S, Pussa T, Arvilommi H, Isolauri E. 2003. Probiotics and prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 361:1869-1871.
- Kinchel CD, Takamine F, LaVoie CP, Mallonee DH, Hylemon PB. 1997. Assessment of fecal bacteria with 7 α -dehydroxylating activity for the presence of *bai*-like genes. *Appl Environ Microbiol* 63: 1185-1188.
- Kitahara M, Takamine F, Imamura T, Benno Y. 2000. Assigemnt of *Eubacterium* sp. VPI 12708 and related strains with high bile acid 7 α -dehydroxylating activity to *Clostridium scindens* and proposal of *Clostridium hylemonae* ap. nov., isolated from human feces. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 971-978.
- Kurdi P, van Veen HW, Tanaka H, Mierau I, Konings WN, Tannock GW, Tomita F, Yokotra A. 2000. Cholic acid is accumulated spontaneously, driven by membrane "pH, in many lactobacilli. *J Bacteriol* 182:6525-6528.
- Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69: 1035S-1045S.
- Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeier J. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 73: 430S-436S.
- Roberfroid MB. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr* 71: 1682S-1687S.
- Rijatmoko D, 2003. Pengaruh susu kuda Sumbawa terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* secara *in vitro* (Thesis). Bogor: Institut Pertanian Bogor.

- Reid G, Howard J, Gan BS. 2001. Can bacterial interference prevent infection? *Trends in Microbiol* 9: 424-427.
- Van Neil CW, Fewunter, Garrison MM, Christakis DA. 2002. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea children: meta-analysis. *Pediatrics* 109:678-784.
- Wells JE Hylemo PB. 2000. Identification and characterization of a bile 7 α -dehydroxylation operon in *Clostridium* sp. strain TO-931, a highly active 7 α -dehydroxylating strain isolated from human feces. *App. Environ Microbiol* 66: 1107-1113.
- Wells JE, Williams KB, Whitehead TR, Heuman DM, Hylemon PB. 2003. Development and application of polymerase chain reaction assay for the detection and enumeration of bile acid 7 α -dehydroxylating bacteria in human feces. *Clin Chin Acta* 331: 127-134.
- Yoshida D. 2004. Screening for secondary bile acid producing bacteria isolated from human feces. (Thesis). Hokkaido: Hokkaido University.