

Isolasi dan Uji Resistensi Beberapa Isolat *Lactobacillus* pada pH Rendah

Isolation and resistance test of several isolates of *Lactobacillus* in low pH

RIANI HARDININGSIH[♥], ROSTIATI NONTA REFINA NAPITUPULU, TITIN YULINERY
Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor 16002.

Diterima: 15 Juli 2005. Disetujui: 4 Desember 2005.

ABSTRACT

Several isolates of *Lactobacillus* had been isolated from Indonesian fermented foods. Four isolates were isolated from tongcai (TT2), sager drink (Sg.Mnd.N2), pindang ikan selar (PSI1) and sawi asin (S5) had been used in this research. The aim of the research was to get *Lactobacillus* isolates as probiotic candidate and to know its resistance to low pH. The treatment were several concentration of low pH of MRS broth medium, i.e. 2; 2.5; 3; and 6.5 (optimal pH). The optical density (OD) was measured after 24, 48, 72, and 96 hours respectively, with three replication by using spectrophotometer ($\lambda = 600$ nm). The results showed that all *Lactobacillus* isolates (i.e. TT2, Sg.Mnd.N2, PSI1, and S5) could be used as probiotic candidate because they were resistant to all of low pH used.

© 2006 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: low pH, *Lactobacillus*, probiotic.

PENDAHULUAN

Lactobacillus termasuk golongan bakteri asam laktat yang sering dijumpai pada makanan fermentasi, produk olahan ikan, daging, susu, dan buah-buahan (Napitupulu *et al.*, 1997). Sejauh ini telah diketahui bahwa keberadaan bakteri ini tidak bersifat patogen dan aman bagi kesehatan sehingga sering digunakan dalam industri pengawetan makanan, minuman dan berpotensi sebagai produk probiotik. Sifat yang menguntungkan dari bakteri *Lactobacillus* dalam bentuk probiotik adalah dapat digunakan untuk mendukung peningkatan kesehatan. Bakteri tersebut berperan sebagai flora normal dalam sistem pencernaan. Fungsinya adalah untuk menjaga keseimbangan asam dan basa sehingga pH dalam kolon konstan.

Cartney (1997) melaporkan bahwa bakteri probiotik menjaga kesehatan usus, membantu penyerapan makanan, produksi vitamin, dan mencegah pertumbuhan bakteri patogen. Selain itu dapat meningkatkan fungsi sistem kekebalan tubuh, metabolisme kolesterol, karsinogenesis, dan menghambat penuaan. Heprer *et al.*, (1979) menyatakan bahwa pemberian suplemen yoghurt selama satu minggu, dapat menurunkan serum kolesterol pada manusia. Yoghurt dan susu menurunkan kolesterol setelah menginduksi hypercholesterolemia kelinci. Yoghurt lebih besar memberi pengaruh dari pada susu.

Lactobacillus mempunyai potensi yang besar sebagai produk probiotik karena keunggulannya dibanding bakteri asam laktat lainnya (Davis dan Gasson, 1981; Muriana dan Klaenhammer, 1987). Selanjutnya Annonym (2000) mengatakan bahwa *Lactobacillus plantarum* dan *L. casei* dapat aktif pada pH rendah dan menghasilkan asam laktat

dalam jumlah banyak sehingga pada makanan ternak dapat membantu menyimpan energi. Napitupulu *et al.* (2000) melaporkan bahwa *Lactobacillus* menghasilkan anti bakteri. Filtrat *Lactobacillus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli*, bahkan filtrat yang sudah disimpan selama 6 bulan memiliki kemampuan sama. *Lactobacillus* juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri lain yang merugikan atau patogen (Tagg *et al.*, 1976; Chassy, 1987). Goldin dan Gorbach (1992) mengatakan bahwa beberapa substansi antimikroba yang dihasilkan bakteri probiotik, misalnya *L. acidophilus* menghasilkan acidotin, acidophilin, bacteriocin, lactocidin, *L. bulgaricus* (bulgarican), *L. plantarum* (lactolin), *L. brevis* (lactobullin, lactobrevin), dan *L. reuteri* (rauterin).

Beberapa kriteria penting untuk karakter fisiologi yang merupakan seleksi kelayakan bakteri sebagai produk probiotik antara lain uji pertumbuhan/resistensi bakteri probiotik pada pH rendah. Fetlinski dan Stepaniak (1994) menyebutkan bahwa dapat tidaknya suatu bakteri sebagai probiotik tergantung resistensi atau ketahanan probiotik terhadap pH rendah, garam empedu, dan kemampuan untuk hidup dalam sistem pencernaan. Berdasarkan hal di atas dilakukan penelitian ini, yang bertujuan untuk mendapatkan isolat *Lactobacillus* terseleksi sebagai kandidat probiotik dengan mengetahui resistensi/ketahanan hidup beberapa isolat bakteri *Lactobacillus* pada pH rendah.

BAHAN DAN METODE

Sampel makanan fermentasi

Sampel makanan fermentasi berasal dari beberapa daerah di Indonesia, yaitu tongcai, minuman sager, pindang ikan selar, dan sawi asin. Pada sampel-sampel makanan ini dilakukan isolasi menggunakan media GYP (*Glucose Yeast Peptone*) dengan komposisi dalam 1 L

[♥] Alamat korespondensi:
Jl.Ir. H.Juanda 18 Bogor 16002
Tel. +62-251-324006. Fax.: +62-251-325854
e-mail: noviknur@yahoo.com

sebagai berikut: glukosa 10 g, yeast ekstrak 10 g, pepton 5 g, beef ekstrak 2 g, Na-acetat.H₂O 1.4 g, salt solution 5 mL (salt solution: MgSO₄.7H₂O 0,1 g; MnSO₄.4H₂O 0,1 g; FeSO₄.7H₂O 0,1 g; NaCl 0,1 g; dH₂O 50 mL) Tween 80 0,5 g, agar 20 g CaCO₃ 0,075 g/mL medium, dH₂O 1 L. Media pemeliharaan isolat *Lactobacillus* adalah media MRS (de Man Rogosa Sharpe) agar (Oxoid), sedangkan media *pre-culture* dan pertumbuhan bakteri uji adalah media MRS Broth (Oxoid).

Isolasi dan karakterisasi bakteri *Lactobacillus*

Isolasi dilakukan dengan mengencerkan 1 g sampel dengan larutan saline (0,85% NaCl) secara duplo pada media GYP. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 2-3 hari. Zona jernih yang terbentuk diduga bakteri asam laktat. Selanjutnya dilakukan pewarnaan gram dan uji katalase untuk mendapatkan bakteri *Lactobacillus*. Pewarnaan gram dilakukan menurut metode Hucker dan Conn dan uji aktivitas katalase dengan H₂O₂ 3%. Reaksi katalase negatif apabila diteteskan pada sel bakteri namun tidak menunjukkan adanya busa atau buih setelah 1 menit.

Karakter fisiologi: Resistensi *Lactobacillus* pada pH rendah

Beberapa *Lactobacillus* yang diperoleh dari isolasi di atas ditanam pada media MRS Broth untuk digunakan sebagai starter dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 2-3 hari. Selanjutnya media MRS broth dimasukkan masing-masing ke dalam tabung sebanyak 20 mL. pH media diatur menurut perlakuan yaitu pH 2; pH 2,5; pH 3 dan pH 6,5 menggunakan pH-meter. Masing-masing perlakuan diinokulasi dengan 10% starter. Sebagai kontrol adalah media MRS broth tanpa penambahan starter. Setelah diinkubasi selama 24, 48, 72, dan 96 jam dilakukan pengukuran OD (*Optical Density*) dengan Spektrofotometer ($\lambda = 600$ nm). Pengukuran dilakukan dengan tiga ulangan

HASIL DAN PEMBAHASAN

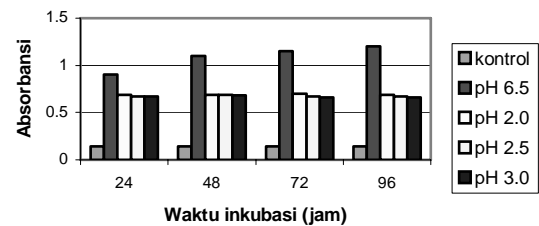
Dari hasil isolasi dan karakterisasi serta identifikasi pada sampel-sampel makanan fermentasi diperoleh empat isolat *Lactobacillus*, yaitu: TT2 (tongcai), Sg.Mnd.N2 (saguer), PSI1 (pindang ikan selar), dan S5 (sawi asin). Pengamatan terhadap bentuk morfologi dan fisiologi biak *Lactobacillus* uji disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Morfologi dan fisiologi bakteri *Lactobacillus* spp.

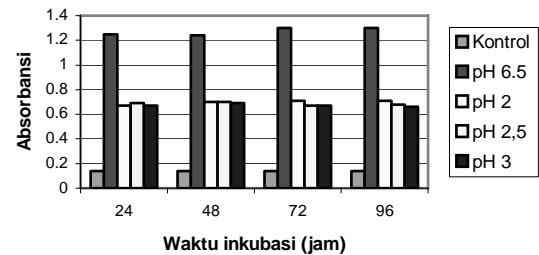
Kode biak	Asal	Gram	Bentuk sel	Reaksi katalase
S5	Sawi asin	+	Rod	-
Sg.Mnd.N2	Saguer	+	Rod	-
PSI1	Pindang selar	+	Rod	-
TT2	Tongcai	+	Rod	-

Empat isolat yang diisolasi merupakan bakteri *Lactobacillus*. Anguirre dan Colins (1993) menyatakan bahwa bakteri asam laktat terdiri atas 4 genus, yaitu *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, dan *Pediococcus*. Genus *Lactobacillus* mempunyai ciri-ciri: bakteri berbentuk batang/rod, gram positif, dan uji katalase negatif. Hasil uji resistensi isolat bakteri *Lactobacillus* yang diisolasi dari masing-masing makanan fermentasi pada beberapa taraf pH rendah disajikan pada Gambar 1-4.

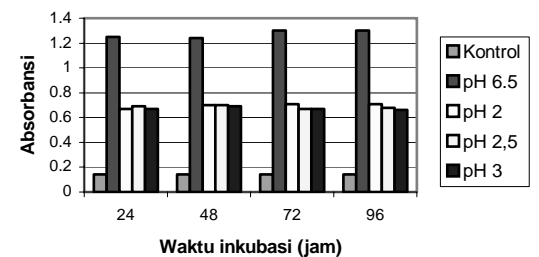
Pada Gambar 1, hasil pengamatan menunjukkan bahwa pengukuran OD terhadap isolat *Lactobacillus* TT2 dengan perlakuan pH rendah (pH 2, pH 2,5 dan pH 3), nilai



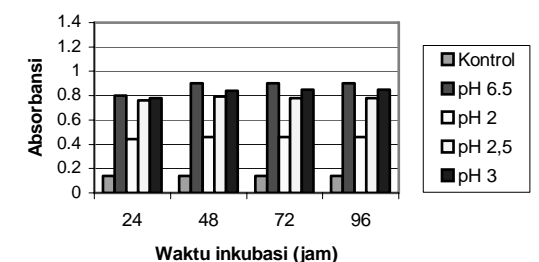
Gambar 1. Uji resistensi isolat bakteri *Lactobacillus* sp. yang diisolasi dari tongcai (TT2) pada pH rendah.



Gambar 2. Uji resistensi isolat bakteri *Lactobacillus* sp. yang diisolasi dari minuman Saguer (Sg.Mnd.N2).



Gambar 3. Uji resistensi isolat *Lactobacillus* sp. yang diisolasi dari pindang selar (PSL1) pada pH rendah.



Gambar 4. Uji resistensi isolat bakteri *Lactobacillus* sp. yang diisolasi dari sawi asin (S5) pada pH rendah.

absorbansinya relatif stabil, sehingga dapat dikatakan bahwa *Lactobacillus* ini resisten dan mampu mempertahankan hidupnya pada kondisi pH rendah. Kerapatan optik (OD) rata-rata berkisar antara 0,66-0,71. Conway *et al.* (1987) mengatakan bahwa bakteri asam laktat lebih toleran terhadap asam. Penelitiannya menggunakan *L. acidiphillus* mempunyai toleransi yang tinggi terhadap asam lambung dari pada *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, yang lebih resisten terhadap *S. salivarius* subsp. *Thermophilus*. Secara in vitro ketahanan terhadap pH rendah tergantung

pada tipe buffer (Hood dan Zottola, 1988) dan keberadaan makanan atau pakan yang digunakan (Conway *et al.*, 1987). Jika individu dalam keadaan berpuasa, pH lambung dapat mencapai 1 atau 2 dan banyak mikroorganisme termasuk *Lactobacillus* dapat bertahan hidup dari 30 detik sampai beberapa menit (Conway *et al.*, 1987).

Bila dibandingkan dengan isolat yang diinokulasi pada pH 6,5 dengan inkubasi selama 24 sampai 96 jam, terlihat kenaikan nilai absorbansinya. Pada pH 6,5 menunjukkan pertumbuhan isolat-isolat *Lactobacillus* yang paling tinggi, karena pH 6,5 merupakan pH optimum untuk pertumbuhan bakteri *Lactobacillus*. Tagg (1976) melaporkan bahwa bakteri asam laktat mempunyai toleransi pH dengan rentang yang luas. Bakteri asam laktat juga mampu mempertahankan pH sitoplasma lebih alkali dari pada pH ekstraseluler (Hutkins dan Nannen, 1993). Gilliland (1990) menyatakan bahwa bakteri gram positif lebih sensitif terhadap lisozim tetapi *Lactobacillus* dan *Streptococcus* lebih resisten terhadap bakteri gram positif lainnya.

Pada Gambar 2 dan 3 perlakuan pH rendah isolat Sg.Mnd.N2 dan PSI1 menunjukkan kecenderungan yang sama seperti pada Gambar 1. Optical density rata-rata stabil setelah inkubasi 24 jam sampai 96 jam. Dari hasil pengamatan tersebut diatas, mengindikasikan bahwa kedua isolat bakteri *Lactobacillus* yang diuji juga mempunyai ketahanan/resistensi terhadap pH rendah. Dengan kata lain, isolat isolat tersebut mempunyai potensi sebagai bakteri probiotik.

Pada Gambar 4 tampak bahwa *Lactobacillus* S5 mempunyai nilai absorbansi lebih tinggi pada pH 6,5, 2,5 dan 3, dari pada pH 2. *Lactobacillus* dari asinan sawi lebih resisten dari pada isolat isolat uji yang lain. Hal ini disebabkan karena karakter fisiologis dari masing-masing *Lactobacillus* berbeda-beda. Perbedaan ketahanan membran sel bakteri terhadap kerusakan akibat terjadinya penurunan pH ekstraseluler menyebabkan keragaman ketahanan sel pada pH rendah. Beberapa peneliti memperkuat pernyataan tersebut seperti Robins-Browne dan Levine (1981) dalam penelitiannya mengatakan bahwa *Lactobacillus delbruekii* dan *S. salivarius* tidak dapat hidup pada usus halus akibat pH rendah pada lambung. Tannock *et al.* (1982) mengindikasikan bahwa strain bakteri yang diisolasi dari indigenous mikroflora dari satu spesies tidak sama dengan spesies lain, meskipun *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* sama-sama diisolasi dari host yang sama tetapi bakteri-bakteri tersebut mempunyai variasi *biotypes* yang berbeda. Hood dan Zottola (1988) menunjukkan bahwa sel *L. acidophilus* tidak dapat tumbuh pada pH rendah tanpa pengaruh lapisan polisakarida yang bersifat asam. Di bawah kondisi in vitro menghasilkan asam organik dan menurunkan pH lambung, dalam kondisi asam menghambat pertumbuhan *E.coli* dan beberapa strain *Lactobacilli* dan streptococci yang menghasilkan asam laktat dalam jumlah besar (Holdeman *et al.*, 1977). Selanjutnya Fox (1988) menjelaskan bahwa bakteri ini dapat menurunkan pH intestin dan menurunkan pertumbuhan yang cepat dari *E. coli*.

Dari hasil-hasil penelitian yang telah tersaji pada Gambar 1-4 tersebut di atas, terlihat bahwa peluang *Lactobacillus* yang berasal dari makanan fermentasi Indonesia, dalam pemanfaatannya sebagai bakteri probiotik adalah cukup besar. Empat isolat *Lactobacillus* uji yang berasal dari makanan fermentasi tersebut tahan/resisten pada pH rendah. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Conway *et al* (1987) bahwa probiotik efektif jika strain telah terseleksi tahan terhadap pH asam dan dapat dikembangkan pada sistem buffer seperti susu, yoghurt

atau makanan. Mikroorganisme probiotik yang digunakan secara oral lebih tahan terhadap enzim dalam mulut (amilase, lisozim) terhadap enzim pepsin atau lipase dan pH rendah (konsentrasi HCL tinggi) pada lambung, konsentrasi asam empedu, getah pankreas dan mucus pada usus halus. Untuk itu perlu kriteria seleksi strain mikroba.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini diperoleh empat isolat bakteri *Lactobacillus* yang diisolasi dari makanan fermentasi Indonesia, yaitu dari tongcai (TT2), minuman saguer (Sg.Mnd.N2), pindang ikan selar (PSL1) dan sawi asin (S5). Empat isolat *Lactobacillus* tersebut berpotensi sebagai bakteri probiotik, karena mampu mempertahankan hidupnya/resisten pada pH yang rendah. Diantara empat isolat *Lactobacillus* yang diuji yang terbaik adalah yang berasal dari sawi asin (S5).

DAFTAR PUSTAKA

- Anguirre, M and M. Colins. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology* 75: 95-107.
- Anonym. 2000. *Pro-Store AT*. Wisconsin: Agri-Nutrition consulting, Inc.
- Cartney, M.M. 1997. *Enzymes, Probiotics and Antioksidan*. New York: Mediterranean Synergy TM. Awareness Corporation. USA
- Chassy, B., M. 1987. Prospect for the genetic manipulation of lactobacilli. *FEMS Microbiology Review* 46:297-312.
- Conway, P.L., S.L. Gorbach, and B.R. Goldin. 1987. Survival of Lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to internal cell. *Journal of Dairy Science* 70:1-12
- Davis, F.L. and Gasson. 1981. Reviews of the progress of dairy science: Genetics of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Review* 48:363-376.
- Fetlinski, A. and L. Stepaniak. 1994. *BIOLACTA-TEXEL* sarl. Warszawska 111, Olsztin, Poland.
- Fox, S.M. 1988. Probiotics: Intestinal inoculants for production animals. *Veterinary Medicine*. August 1988: 806-830.
- Gilliland, S.E. 1990. Health and Nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 87:175-188.
- Goldin, B.R. and S.L.Gorbach. 1992. Probiotic for humans. In Fuller, R. *Probiotic the Scientific Basis*. London: Chapman & Hall.
- Heprer, G. Fried, R. St Jean. 1979. Hypocholesterolemic effect of yoghurt and milk. *American Journals of Clinical Nutrition* 32:19-24.
- Holdeman, L.U., Gato, E.P. and Moore. W.E.C. 1977. *Anaerobe Laboratory Manual*. 4th ed. Virginia: Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Hood, S.K. and E.A. Zottola. 1988. Effect of low on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *Journal of Food Science* 53: 1514-1516.
- Hutkins, R.W., Nannen, N.L. 1993. pH homeostatis in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 76: 2354-2365.
- Muriana, P.M. and T.R. Klaenhammer. 1987. Conjugal transfer of plasmid encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 552-560.
- Napitupulu N.R., A. Kanti, T. Yulinery, R. Hardiningsih, dan Julistiono, H. 1997. DNA plasmid *Lactobacillus* asal makanan fermentasi tradisional yang berpotensi dalam pengembangan sistem inang vektor untuk bioteknologi pangan. *Jurnal Mikrobiologi Tropis* 1: 91-96.
- Napitupulu, N., T. Yulinery, dan R. Hardiningsih. 2000. *Pengaruh Lama Penyimpanan, Suhu dan Media terhadap Kemampuan Antibakteri yang Dihasilkan Lactobacillus dalam Menghambat pertumbuhan Beberapa Bakteri Patogen*. [Laporan Teknik]. Bogor: Proyek penelitian Pengembangan dan Pendayagunaan Biota Darat, Pusat Penelitian Biologi LIPI.
- Robins-Browne, R.M. and M. Levine. 1981. The fase of ingested Lactobacilli in the proximal small intestine. *American Journals of Clinical Nutrition* 34: 514-519.
- Schafasma, G. 1996. State of the art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutrition Newsletters* 5: 23-24.
- Tagg, J.R. 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriology Review* 40: 722-756.
- Tannock, G.W., O. Szylit, and P. Raibaud. 1982. Colonization of tissue surfaces in the gastrointestinal tract of gnotobiotic animal by *Lactobacillus* strains. *Canadian Journal of Microbiology* 28:1196-1198.