

KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT NWD 015 HASIL ISOLASI DARI FESES PEDET DAN PENGARUH BAKTERIOSIN TERHADAP BAKTERI PATOGENNafiatul Umami, Zaenal Bachruddin dan Lies Mira Yusiati¹**INTISARI**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri asam laktat (BAL) yang mempunyai aktivitas laktase tinggi dan menghasilkan bakteriosin. Feses pedet digunakan sebagai sumber mikrobia untuk mendapatkan isolat BAL. Isolasi pada medium MRS secara anaerobik, suhu 39°C selama 24 jam. Seleksi berdasarkan pada produksi asam laktat, tipe katalase, tipe fermentasi, pewarnaan gram dan morfologi sel. Data hasil dianalisis dengan analisis variansi pola searah (*Completely Randomized Design*) dan dilanjutkan uji *Duncan's New Multiple Range Test* (DMRT). Pada penelitian pertama telah didapatkan isolat BAL NWD 015 yang mempunyai aktivitas laktase tertinggi dan telah diketahui kadar susu 50% terbaik untuk pertumbuhan BAL NWD 015. Kadar susu terbaik untuk pertumbuhan BAL diuji bakteriosinnya dengan metode *Turbidimetric assay*. Data *optical density* pada uji bakteriosin diuji dengan regresi non-linear. Dari isolasi diperoleh 18 isolat BAL yang mempunyai spesifikasi menghasilkan laktat, katalase negatif, homofermentatif, gram positif dan kokus. Hasil pengujian bakteriosin menunjukkan bahwa BAL NWD 015 dalam medium MRS dan susu 50% menghasilkan bakteriosin yang dapat memperpanjang fase lag serta menekan pertumbuhan bakteri patogen yaitu *Staphylococcus aureus*.

(Kata kunci: Bakteri asam laktat, Laktase, Bakteriosin)

Buletin Peternakan 30 (1): 10 - 16, 2006

¹ Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA NWD 015 AND EFFECT OF BACTERIOICIN ON PATOGENIC BACTERIA

ABSTRACT

The objective of this study was to isolate lactic acid bacteria (LAB), which has high lactase activity and produces bacteriocin. Feces of young calves as microbe source was used to obtain LAB using MRS medium anaerobically and incubated at 39°C for 24 hours. The selection include lactic acid production, catalase type, fermentation type, gram staining and cell morphology. The data were analyzed by the analysis of variance pattern Completely Randomized Design, and Duncan's New Multiple Range Test. The first study found that LAB NWD 015 had the highest lactase activity isolate and 50% milk was the best concentration for fermentation. The milk concentration with milk content in medium for the best growth of LAB was used to evaluate bacteriocin production with Turbidimetric assay method. The data on bacteriocin test were analyzed using non-linear regression test. The 18 isolates were identified as LAB having specification producing lactic acid, negative catalase, homofermentation, positive gram and cocci in nature. The bacteriocin extract from MRS and 50% milk medium prolonged log phase and inhibited of pathogenic bacteria, that was *Staphylococcus aureus* growth.

(Key words: Lactic acid bacteria, Lactase, Bacteriocin)

Pendahuluan

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan bakteri yang mampu menghasilkan asam laktat. Banyak penelitian yang menunjukkan nilai lebih BAL, seperti mampu menjadi anti stres dan menghasilkan bakteriosin yang berperan menjaga keseimbangan mikroflora saluran pencernaan dan berhubungan dengan kesehatan ternak.

Keberadaan bakteriosin menguntungkan dalam saluran intestinum karena akan menurunkan jumlah mikroorganisme patogen, sehingga fungsi saluran pencernaan (usus) untuk menyerap nutrisi dapat berjalan optimal.

Klaenhammer dan Sanders (2001) melaporkan bahwa *Lactobacillus acidophilus* yang ditambahkan pada skim milk untuk menurunkan *Escherichia coli* di saluran pencernaan tikus, menunjukkan hasil penurunan *E. coli* proporsional dengan peningkatan *Lactobacillus acidophilus*. Lebih lanjut disebutkan bahwa *Lactobacillus acidophilus* yang berada dalam medium

laktosa mampu memproduksi atau menghasilkan komponen yang merupakan senyawa inhibitor bakteri lain seperti *E. coli*. Di dalam saluran pencernaan diperkirakan terdapat 10^{13} sel bakteri, yang terdiri dari 400 species bakteri yang bersimbiosis dengan ternak inangnya. Tidak semua bakteri dapat hidup di dalam saluran pencernaan. Mikroorganisme yang mampu bertahan adalah mikroorganisme yang terseleksi untuk tumbuh dan berkoloni. Adanya agen inhibitor seperti *volatile fatty acid* (VFA), H_2S , asam empedu, *lysozyme* dan *lysolecithine* menyebabkan bakteri tertentu tidak dapat bertahan (Fuller, 1982 yang disitasi Stark dan Wilkinson, 1988).

Bakteri yang tumbuh dan berkoloni di saluran pencernaan akan terikat dengan laju aliran pakan sehubungan dengan gerak peristaltik yang membawa pakan ke akhir saluran pencernaan. Secara alami ada dua mekanisme yang menjaga agar mikroorganisme tetap ada di saluran pencernaan, yaitu dengan menempel erat pada epitel dinding saluran dan dengan cara tumbuh

dan berkoloni secara cepat, sehingga mengimbangi jumlah mikroorganisme yang ada di sana sehubungan dengan laju aliran pakan (Stark dan Wilkinson, 1988).

Rahardja (1978) menjelaskan bahwa beberapa antibiotik bekerja terhadap dinding sel (penisilin dan sefalosporin) atau membran sel (kelompok polimiksin). Mekanisme kerja antibiotik yang lain, yaitu kloramfenikol, tetrasiklin, aminoglikosida dan makrolida, adalah penghambatan selektif metabolisme protein bakteri sehingga sintesis protein terhambat dan mati. Efek penghambatan antibiotik pada sebagian besar jenis virus tidak berjalan aktif, hal ini dapat dimungkinkan karena pada tubuh virus tidak ada proses metabolisme yang sesungguhnya, karena hanya bergantung pada inang.

Antibiotik banyak digunakan di bidang peternakan sebagai zat-zat tambahan guna mempercepat pertumbuhan. Rahardja (1978) menyatakan bahwa ternak dan unggas yang diberi penisilin, tetrasiklin, eritromisin dan basitrasin tumbuh lebih pesat. Di semua negara Barat penggunaan antibiotik untuk maksud ini sudah dilarang karena dapat menyebabkan resistensi bakteri dan produk peternakan dapat mengandung sisa antibiotik tersebut.

Menurut Mutschler (1991) istilah antibiotik pada mulanya adalah zat yang dibentuk oleh mikroorganisme yang dapat membunuh dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain. Definisi ini menjadi meluas karena dapat pula dibentuk oleh beberapa hewan, tanaman tinggi dan sekarang sudah banyak antibiotik sintetik.

Strain tertentu dari *Streptococcus cremoris* menghasilkan bakteriosin yang disebut *diplococcin*, *Diplococcin* efektif menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* tetapi tidak efektif terhadap *Escherichia coli*. *Streptococcus lactis* menghasilkan bakteriosin nisin yang stabil terhadap panas dan pH rendah (asam). Nisin merupakan peptida kecil yang mempunyai spektrum aktivitas kecil dan aktif pada bakteri gram positif (Gilliland, 1985). *Lactobacillus*

acidophilus menghasilkan bakteriosin yang disebut *lactocidin*, *acidophilin* dan *acidolin*. *Acidolin* dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* selama pertumbuhannya dalam susu dan aktif pada bakteri gram positif dan gram negatif. *Lactolin* dihasilkan hanya pada media padat dan tidak dapat diisolasi dari media cair. *Acidolin* dihasilkan selama pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* dalam susu dan aktif pada bakteri gram negatif (Gilliland, 1985). Publikasi ini melanjutkan publikasi penelitian sebelumnya, telah dilakukan usaha isolasi bakteri asam laktat dari feses pedet dan telah diketahui kemampuan tumbuhnya pada media air susu sapi dengan berbagai level konsentrasi pengenceran dan yang terbaik adalah 50% air susu (Umami *et al.*, 2004) dimana pada penelitian ini akan diamati pengaruh bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL hasil isolasi dari feses pedet terhadap bakteri patogen yaitu *Staphylococcus aureus*.

Materi dan Metode

Penelitian ini adalah tahap kedua yaitu penggunaan isolat BAL NWD 015 yang diperoleh dari isolasi tahap pertama dan dilakukan karakterisasi yang meliputi tipe fermentasi, pengecatan gram, tipe katalase, derajat keasaman (Nahm, 1992) isolat ini diuji aktivitas bakteriosinnya pada bakteri patogen yaitu *Staphylococcus aureus*. Isolat ditumbuhkan pada berbagai medium yaitu MRS dan air susu 50%. Kadar bakteriocin diamati pada isolat pilihan BAL NWD 015 serta pada medium susu yang telah diinokulasi BAL NWD 015. Pertama-tama dilakukan produksi bakteriosin yang dapat ditemukan dalam metabolit sekunder. Ekstraksi bakteriosin dilakukan dengan cara medium fermentasi (susu 50% dan MRS) dengan BAL NWD 015 diambil supernatannya dengan sentrifugasi 15.000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh disterilisasi dengan cara menyaring dengan filter bakteri (diameter porous 0,2 μm Whatman). Pengukuran produksi bakteriosin

menggunakan metode *Turbidimetric Assay* (Davidson dan Parish, 1989 yang disitasi oleh Djafar, 1994). Metabolit ekstraseluler steril dicampur dengan medium, pH 6,5 (V/V = 1:1) kemudian diberi biakan *Staphylococcus aureus* FNCC 158 yang telah ditumbuhkan pada medium Nutrien broth, sebanyak 1%. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37^o C. Pengambilan sampel dilakukan setiap jam pengamatan sehingga didapat grafik pertumbuhan dengan mengukur absorbansinya. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 600 nm. Pengukuran pH juga dilakukan pada setiap titik pengamatan. Kontrol berupa medium yang diinokulasi dengan *S. aureus* FCNN 158 sebanyak 1% tanpa penambahan metabolit ekstraseluler (diganti dengan aquades steril). Penghambatan pertumbuhan *S. aureus* FNCC 158 diukur dengan melihat adanya perpanjangan fase lag dari sel yang diberi metabolit ekstraseluler atau membandingkan tingkat pertumbuhan

akhir sel yang diberi metabolit ekstraseluler dengan kontrol.

Analisis data

Data pengamatan OD aktivitas bacteriosin pada kontrol, pada bacteriosin dari susu dan dari MRS dengan menggunakan regresi non linear.

Hasil dan Pembahasan

Karakterisasi bakteri asam laktat

Karakterisasi BAL hasil isolasi terlihat pada Tabel 1 terdapat 18 isolat yang merupakan BAL. Morfologi sel yang terlihat dari hasil gram staining dengan menggunakan mikroskop elektron, menunjukkan bentuk BAL dari lima isolat hasil isolasi adalah kokus. Lindquist (1998) menyatakan bahwa BAL dapat berbentuk batang, kokus, kokus yang berpasangan, rantai atau kokus dalam tetrad.

Tabel 1. Karakterisasi bakteri asam laktat hasil isolasi, pH akhir medium MRS dan kadar asam laktat pada jam ke- 24 (*Characterisation of lactic acid bacteria, pH MRS medium and lactic acid production at 24th time*)

No	Nama Isolat (<i>Isolate</i>)	Tipe Fermentasi (<i>Fermentation type</i>)	Pewarnaan Gram	pH	Tipe Katalase (<i>Catalase type</i>)
1	NWD 017	-	+	4,06	-
2	NWD 027	-	+	4,09	-
3	NWD 018	-	+	4,07	-
4	NWD 002	-	+	5,38	-
5	NWD 009	-	+	4,13	-
6	NWD 018	-	+	4,07	-
7	NWD 032	+	+	4,18	-
8	NWD 008	-	+	4,04	-
9	NWD 004	+	+	4,17	-
10	NWD 015	-	+	4,07	-
11	NWD 031	-	+	4,08	-
12	NWD 013	+	+	4,04	-
13	NWD 030	-	+	4,19	-
14	NWD 019	-	+	4,04	-
15	NWD 029	+	+	4,09	-
16	NWD 026	+	+	4,16	-
17	NWD 028	+	+	4,09	-
18	NWD 033	+	+	4,01	-

Pada hasil pewarnaan Gram semua isolat menunjukkan gram positif. Olesan bakteri yang terfiksasi dikenai larutan ungu kristal, larutan yodium, alkohol dan safranin atau beberapa pewarna lain yang sesuai. Menurut Pelczar (1986) bakteri yang diwarnai dengan metode gram ini dibagi menjadi dua kelompok, salah satu diantaranya bakteri gram positif yang mempertahankan zat pewarna ungu kristal sehingga terlihat warna ungu dibawah mikroskop elektron. Kelompok yang lain adalah bakteri gram negatif kehilangan ungu kristal ketika dicuci dengan alkohol dan sewaktu diberi pewarna tandingan dengan warna merah safranin, terlihat berwarna merah. Perubahan warna ini disebabkan karena perbedaan dalam struktur kimiawi permukaannya.

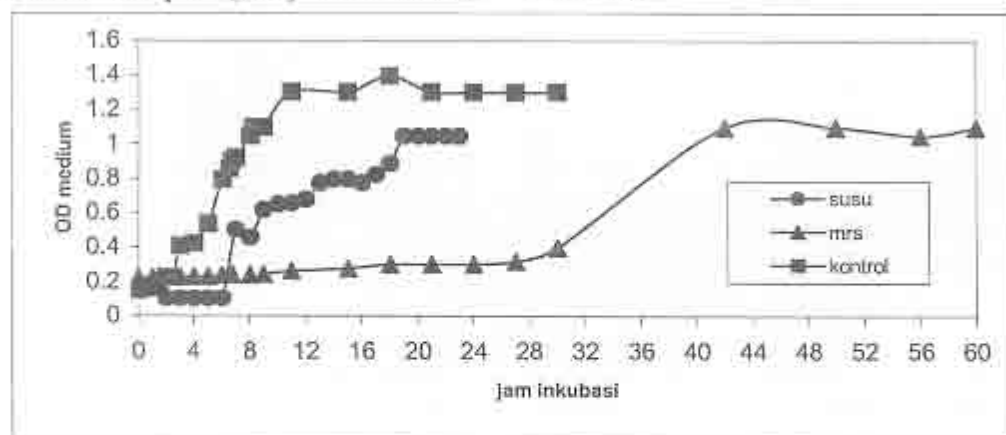
Hasil pengujian tipe katalase menunjukkan bahwa semua isolat katalase negatif. Tipe katalase diuji dengan meneteskan H_2O_2 pada suspensi bakteri. Katalase positif ditandai dengan adanya gelembung udara pada suspensi bakteri, sedangkan katalase negatif tidak adanya gelembung udara. Katalase negatif berarti tidak adanya katalase dari bakteri yang dapat bereaksi dengan H_2O_2 yang dihasilkan sehingga tidak diproduksi gas. Menurut Lindquist (1998) enzim katalase

adalah enzim yang dihasilkan oleh organisme untuk mendetoksifikasi H_2O_2 yang dihasilkan selama proses respirasi aerobik.

BAL dengan tipe fermentasi positif ditunjukkan dengan adanya gelembung udara pada tabung Durham, tipe fermentasi positif menunjukkan BAL heterofermentatif yang artinya BAL menghasilkan produk akhir tidak hanya berupa asam laktat tetapi CO_2 , alkohol dan asam asetat. BAL yang menunjukkan tipe fermentasi negatif menunjukkan BAL yang bersifat homofermentatif dimana produk akhir fermentasi berupa asam laktat (Lindquist, 1998). Pada hasil pengamatan dengan menggunakan tabung Durham lima isolat yang mempunyai laktat tertinggi tidak dijumpai adanya gelembung gas CO_2 . CO_2 adalah gas yang sangat mudah larut dalam air, tabung Durham akan mendeteksi produksinya ditandai dengan adanya gelembung berbentuk cincin pada bagian atas tabung Durham (Lindquist, 1998). Untuk pengujian aktivitas bakteriosin digunakan isolat BAL NWD 015.

Bakteriosin

Aktivitas penghambatan *Staphylococcus aureus* FNCC 158 oleh ekstrak produk fermentasi BAL NWD 015 terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. *Optical density* medium pertumbuhan *Staphylococcus aureus* FNCC 158 pada uji bakteriosin (*Optical density growth medium of Staphylococcus aureus* FNCC 158 on bacteriocin test)

Pada Gambar 1 terlihat adanya perpanjangan fase lag dari *Staphylococcus aureus* FNCC 158 yang ditumbuhkan dengan medium MRS yang ditambah dengan ekstrak produk fermentasi BAL pada medium susu dibanding dengan ekstrak produk fermentasi BAL yang ditumbuhkan pada medium MRS. Aktivitas penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* FNCC 158 ditunjukkan dengan perpanjangan fase lag pada perlakuan dengan penumbuhan *Staphylococcus aureus* pada medium yang ditambah ekstrak produk fermentasi BAL dibanding dengan yang kontrol, ditunjukkan dengan perpanjangan fase lag pada perlakuan dengan ekstrak produk fermentasi BAL NWD 015 dibanding dengan yang kontrol. Lewus dan Montville (1991) menyatakan bahwa bakteriosin adalah salah satu produk metabolit yang dihasilkan oleh BAL yang akan menghambat pertumbuhan bakteri lain, salah satunya adalah *Staphylococcus aureus*. Adanya perpanjangan fase lag pada perlakuan dibanding kontrol pada Gambar 1 menunjukkan adanya aktivitas bakteriosin yang dihasilkan BAL NWD 015 yang menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* FNCC 158.

Produk fermentasi yang diekstraksi dari BAL NWD 015 dengan medium MRS menunjukkan penghambatan sampai pada jam ke-27 sedangkan untuk produk fermentasi yang diekstraksi dari BAL dengan medium susu penghambatan sampai pada jam ke-4. Perbedaan ini disebabkan dalam medium yang

mengandung substrat berbeda di mana MRS mengandung substrat glukosa dan susu mengandung substrat laktosa, sehingga kemampuan BAL untuk memproduksi metabolit juga berbeda. Hal ini sependapat dengan yang dikemukakan oleh Lewus dan Montville (1991), bahwa dalam suatu pengujian aktivitas bakteriosin tidak selamanya menunjukkan hasil yang sama, hal ini dapat dikarenakan tidak sensitifnya bakteri kontrol yang digunakan atau dapat juga karena metode dan medium yang digunakan tidak tepat.

Hasil penelitian Lewus dan Montville (1991) menjelaskan bahwa dari 22 isolat ternyata 19 isolat yang diduga bersifat bakteriosinogenik hanya 2 isolat yang aktivitas antimikrobiana dapat dideteksi pada supernatan. Oleh karena itu mereka mengemukakan bahwa keberhasilan uji aktivitas antimikrobia selain ditentukan oleh isolat bakteri produsernya, juga sangat ditentukan oleh metode, medium dan bakteri indikator yang digunakan.

Pada Gambar 1 terlihat pula bahwa bakteriosin mampu menekan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* FNCC 158, pada saat mengalami fase eksponensial yang berarti saat bakteri tumbuh aktif, pada medium yang mengandung bakteriosin lebih rendah dibandingkan dengan kontrol.

Data pengamatan OD aktivitas bakteriosin pada kontrol, pada bakteriosin dari susu dan dari MRS dengan menggunakan regresi Non Linear terlihat pada Tabel. 2.

Tabel 2. Persamaan kekeruhan (OD) terhadap waktu (jam) pertumbuhan *Staphylococcus aureus* FNCC 158 pada medium dengan sumber bakteriosin BAL NWD 015 yang ditumbuhkan pada medium yang berbeda. (*Optical density vs. time of growth of Staphylococcus aureus FNCC 158 on the diferent bacteriocin*)

Perlakuan sumber bakteriosin (<i>Treatment bacteriocin source</i>)	Persamaan (<i>Equilibrium</i>)
Medium susu (<i>milk medium</i>)	$Y=1,1083-1,1796 e^{(-0,1288x)}$
Medium MRS (<i>MRS medium</i>)	$Y=0,1280-0,3061 e^{(-0,0727x)}$
Kontrol perlakuan (<i>Control</i>)	$Y=1,4074-1,4855 e^{(-0,1433x)}$

Pada Tabel 2 terlihat y sebagai fungsi optical density (OD) akan dicapai maksimal pada waktu inkubasi (x) yang berbeda. Sumber bakteriosin yang berbeda memberikan nilai slope yang berbeda. Hasil dengan slope yang berbeda-beda, ini menunjukkan bahwa kecepatan tumbuh bakteri kontrol *Staphylococcus aureus* FNCC 158 berbeda.

Kesimpulan

BAL NWD 015 menghasilkan bakteriosin sebagai metabolit ekstraseluler yang mampu menghambat dan menekan pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus* FNCC 158 yaitu dengan memperpanjang fase lag pertumbuhan bakteri.

Daftar Pustaka

- Astuti, M. 1980. Rancangan Percobaan dan Analisis Statistik. Fakultas Peternakan. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Bendich, A. 1993. Physiological role of antioxidants in the immune system. *J. Dairy Sci.* 76: 2789-2794.
- Djafar, T. F. 1994. Bakteri Asam laktat dari Makanan Tradisional dan Potensi Bakteriosinnya. Tesis. Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Jurusan Ilmu-Ilmu Pertanian, Program Pasca Sarjana, UGM, Yogyakarta.
- Gilliland, S. E. 1985. Bacterial Starter Culture for Foods. 5th ed. CRC. Press Inc, Florida.
- Klaenhammert, T. R., Sanders, M. E., 2001. Invited review: The scientific basic of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J. Dairy Science* 84: 319-331
- Lewus, C. B. and T.J. Montville, 1991. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 13: 145-150.
- Lindquist, John. 1998. General Overview of the Lactic Acid Bacteria. <http://www.splammo.net/bact102/102xlactics.html>.
- Mutschler, Eams, 1991. Dinamika Obat. Buku Ajar farmakologi dan toksikologi. 5th ed. ITB, Jakarta.
- Nahm, K. H. 1992. Practical Guide to Feed, Forage and Water Analysis (Accurate Analysis with Minimal Equipment). Yoo Han Publishing Inc, Korea.
- Pelczar, Jr., E. C. S. Chan and M. F. Pelczar. 1986. Dasar-Dasar Mikrobiologi I. UI Press, Jakarta.
- Rahardja, Kirana. 1978. Obat-Obat Penting Khasiat Penggunaan dan Efek. UI Press, Jakarta.
- Stark, B. A., J. M. Wilkinson. 1989. Probiotics. Theory and Applications. Proceeding Conference The AFRC Institute of Grassland and Animal Production. Hurley, Cholcombe Production, Britain.
- Umami, N., Zaenal Bachruddin and Lies Mira Yusiati. 2004. Produksi Bakteriosin Oleh Bakteri Asam Laktat Dengan Laktase Tinggi: 1. Seleksi Bakteri Asam Laktat Dan Pertumbuhannya Dalam Susu. Prosiding Seminar Nasional dan Pra-Kongres PBBML. Yogyakarta. ISBN979-96008-1-2