DAYA HAMBAT SUSU HASIL FERMENTASI *Lactobacillus acidhopillus* TERHADAP *Salmonella thypimurium*

Agil Antono, Dike Bagus Pamuji, Sugiyartono, Isnaeni*

Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya

*Corresponding author: isna_yudi@yahoo.com

ABSTRACT

Growth inhibitory activity of fermented milk produced by probiotic microorganism Lactobacillus acidophilus on Salmonella thypimurium has been studied. The fermented milk has been prepared by inoculating the Lactobacillus acidophilus on pasteurized milk at 43^oC and then incubated at room temperature for 24 hours. Characterization of fermentation product has been carried out every three hours and focused on viability cell; that affected by pH value. Both of the factors have correlation with inhibitory activity against Salmonella thypimurium. Duration of the fermentation process has a great influence on the cell viability, pH, and anti bacterial activity against Salmonella thypimurium. The longer of the fermentation process, the lower of pH value because of accumulating lactic acid produced by Lactobacillus acidophilus. Result of the research showed that pH of fermentation broth reached 4,93 after 24 hours. Biomass obtained that calculated by Total Plate Count for 18 hours fermentation showed increasing trend from 1,37x10^5 to 1,23x10^{12} cfu/mL fermentation broth. The colonies decreased up to 1,26x10^7 cfu/mL after 24 hours fermentation process, while diameter of inhibition zone 15,3 ± 0,4243 mm showed the highest activity against Salmonella thypimurium in comparison to other achievement before.

Keywords : *Lactobacillus acidophilus, fermented milk, inhibitory activity, Salmonella thypimurium.*

ABSTRAK

Telah dilakukan kajian tentang aktivitas hambatan susu hasil fermentasi mikroba probiotik Lactobacillus acidophilus terhadap pertumbuhan Salmonella thypimurium. Susu fermentasi dibuat dengan cara inokulasi Lactobacillus acidophilus pada susu yang telah dipasturisasi. Inokulasi dilakukan pada suhu 43^oC, selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Karakterisasi susu fermentasi dilakukan setiap tiga jam, difokuskan pada viabilitas sel mikroba probiotik yang dipengaruhi oleh pH. Baik jumlah koloni mikroba probiotik yang hidup maupun pH memiliki korelasi terhadap aktivitas daya hambat terhadap pertumbuhan Salmonella thypimurium. Lama waktu fermentasi sangat berpengaruh baik terhadap viabilitas sel, pH dan aktivitas daya hambat terhadap Salmonella thypimurium. Semakin lama proses fermentasi, pH kaldu fermentasi semakin rendah, karena akumulasi asam laktat dan asam lain yang diproduksi oleh L. acidophilus. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa pH kaldu fermentasi mencapai 4,93 setelah 24 jam. Biomassa yang dihasilkan dihitung sebagai Angka Lempeng Total (ALT) selama 18 jam fermentasi menunjukkan kecenderungan

meningkat dari 1,37x10^{5} menjadi 1,23x10^{12} cfu/mL kaldu fermentasi. Jumlah koloni menurun menjadi 1,26x10^{7} cfu/mL setelah 24 jam fermentasi, sedangkan diameter zona hambat mencapai 15,3 ± 0,4243 mm, menunjukkan aktivitas tertinggi dibandingkan aktivitas yang dihasilkan selama waktu fermentasi sebelumnya.

Keywords : *Lactobacillus acidophilus, susu fermentasi, daya hambat, Salmonella thypimurium.*

PENDAHULUAN

Probiotik merupakan satu atau campuran kultur mikroorganisme hidup yang diberikan kepada manusia atau hewan baik dalam bentuk sel kering atau sebagai produk fermentasi yang dapat memberikan efek menguntungkan pada *host* melalui peningkatan jumlah flora normal tubuh. Definisi ini juga berarti bahwa produk probiotik, misalnya bio-yoghurt, mengandung mikroorganisme hidup dan meningkatkan kesehatan tubuh manusia atau hewan melalui efek menguntungkan pada saluran pencernaan (Huis in't Veld dan Havenaar, 1991).

Bakteri asam laktat merupakan probiotik yang paling banyak memberikan efek menguntungkan pada saluran pencernaan manusia. Baktei ini merupakan Gram-positif yang hidup pada kondisi non-aerob, tetapi juga dapat hidup dalam keadaan aerob (Holzapfel *et al*., 2001; Anal and Singh, 2007).

Efek probiotik spesifik untuk setiap galur (Kekkonen *et al*., 2007) dan ini merupakan salah satu alasan pentingnya menentukan genus dan spesies bakteri probiotik ketika menyatakan manfaat kesehatan. Efek probiotik bagi kesehatan yang menguntungkan dapat bersumber dari produksi asam dan/ atau bakteriosin, kompetisi dengan patogen serta peningkatan sistem imun (Chen and Chen, 2007). Dosis efektif penggunaan probiotik disesuaikan

dengan galur bakteri (Sanders, 2008), namun pada 10^6–10^7 CFU/g produk per hari secara umum sudah dapat diterima (Krasaekoopt *et al*., 2003).

Fermentasi merupakan aktivitas mikroorganisme untuk mendapatkan energi yang diperlukan untuk metabolisme dan pertumbuhan melalui pemecahan atau katabolisme terhadap senyawa organik secara anaerobik. Proses fermentasi pada susu, terjadi pemecahan laktosa menjadi asam laktat yang lebih mudah dicerna tubuh (Rahman *et al*, 1992).

Lactobacillus acidopilus merupakan probiotik yang selama bertahun-tahun banyak digunakan, karena aman dan tidak menimbulkan resiko infeksi berupa bakterimia (Snydman, 2008). *Lactobacillus acidophillus* dapat menghambat partum-buhan bakteri patogen seperti *Salmonella thypimurium* (X. Pan *et al*, 2009), yaitu bakteri yang dapat menyebabkan terjadinya infeksi saluran cerna, dikenal dengan nama salmonellosis. Angka kejadian dapat mencapai 14 kasus untuk setiap 100.000 orang (MMWR Weekly, 2006). Dilaporkan terjadinya 30.000 kasus Salmonellosis setiap tahun di US (CDC, 2005). Pada tahun 2005 terjadi lebih dari 36.000 kasus yang dilaporkan oleh laboratorium kesehatan dari berbagai negara (CDC, 2007).

Kemampuan mikroba probiotik dalam menghambat pertumbuhan mikroba pathogen menarik untuk dikaji dan selanjutnya dieksplorasi guna memperoleh senyawa bioaktif dengan potensi tinggi. Keuntungan probiotik sebagai mikroba non-patogen yang berasal dari flora normal menekan efek samping dan toksisitas yang biasanya menjadi kendala pada pengobatan dengan antibiotik.

Penelitian ini diharapkan mampu meng-hasilkan temuan bermakna terkait

pemanfaatan mikroba sebagai sumber senyawa bioaktif.

BAHAN DAN METODE

Lactobacillus acidophillus

Didapatkan dari hasil isolasi yang dilakukan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Dibiakan dalam media deMann Rogosa and Sharpe (MRS) brooth.

Proses Fermentasi

Susu sapi murni (pH 6,43±0,02; viskositas 0,4±0,0 dpas) yang telah dipasteurisasi, ditambah 2% suspensi inokulum *Lactobacillus acidopilllus* dalam media MRS *brooth* berumur 24 jam. Dilakukan pendiaman pada suhu kamar selama 24 jam. Kemudian dilakukan pengambilan sampel pada jam ke 0. 3. 6. 9. 12. 18. 24.

Penetapan pH

Sampel secukupnya diukur dengan pH-meter SCHOTT glass mainz tipe CG 842, dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

Penetapan Angka Lempeng Total (ALT)

Sebanyak 1 mL sampel diencer-kan 10 kali dengan dapar fosfat pH 7,2, kemudian diambil 1 mL, dimasukkan ke dalam cawan petri steril, ditambah media MRS agar suhu 45-50^{o}C, dihomogenkan, didiamkan hingga memadat, dan diinku-basi selama 42 jam pada suhu 37 ^{o}C. Dihitung jumlah koloni pada cawan petri yang mengandung 30-300 cfu dan dikalikan pengencerannya.

Uji Aktivitas

Dilakukan pada media *Nutrient agar* dengan *base layer* 10 mL dan *seed layer* 8 mL menggunakan bakteri uji *Salmonella thypimurium* yang dibuat inokulum dengan transmitan 50% pada panjang gelombang 580 nm. Sebanyak 5 µL inokulum bakteri uji, ditambahkan ke dalam media perbenihan (*seed layer*), dikocok dengan vortex, dituangkan ke atas permukaan media

dasar (*base layer*) dalam cawan petri, didiamkan hingga memadat. Dibuat cetak lubang, diisi dengan 50 µL larutan sampel, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Diameter zona yang terbentuk di sekitar pencadang diukur (mm).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil fermentasi susu oleh *Lactobacillus acidhopillus* menunjukkan profil jumlah bakteri per satuan waktu yang berbeda, demikian pH dan aktivitasnya (Tabel 1). Grafik pada Gambar 1 memberikan informasi bahwa semakin lama waktu fermentasi, maka harga pH semakin menurun. Fenomena ini dapat dijelaskan melalui pendekatan terbentuknya asam laktat dan asam lain sebagai hasil fermentasi susu oleh *Lactobacillus acidhopillus*. Semakin banyak produksi asam, maka pH susu fermentasi akan semakin rendah.

Menurut Robinson dan Tamime (1981), bakteri asam laktat dapat memproduksi laktase yang mengkatalisis pemecahan laktosa menjadi asam laktat. Penurunan pH disebabkan adanya akumulasi asam hasil aktivitas mikroba yang menyebabkan terjadinya perubahan misel, sehingga akan terjadi penggumpalan. Berdasarkan data dalam Tabel 1, hasil fermentasi menyebabkan penurunan pH mulai jam ke-9.

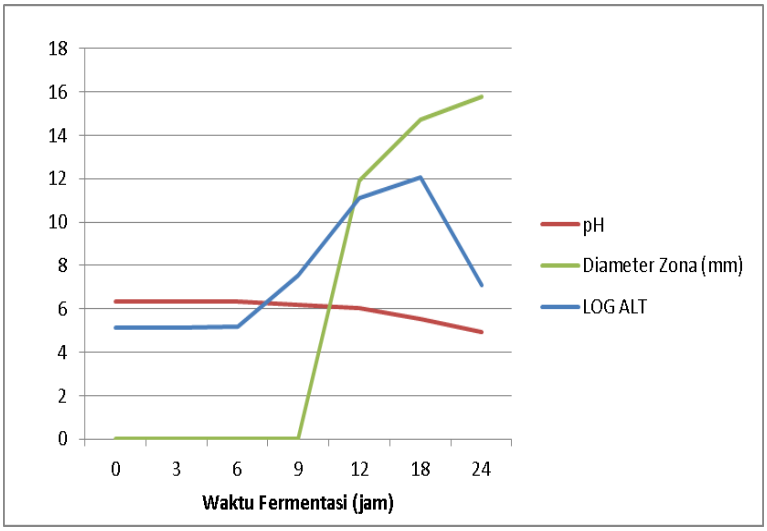
Tabel 1. Hasil pengamatan pH, Diameter Zona Hambat, dan Angka Lempeng Total (ALT) selama proses fermentasi

Jam Ke	pH ± SD	Diameter Zona Hambat (mm) ± SD	ALT (cfu/mL)	Log ALT
0	6,35 ± 0,0057	-	$1,37x10^5$	5,1367
3	6,35 ± 0,0000	-	$1,40x10^5$	5,1461
6	6,32 ± 0.0058	-	$1,50x10^5$	5,1761
9	6,19 ± 0.0200	-	$3,50x10^7$	7,5441
12	6,04 ± 0,0058	11,9 ± 0.7778	$1,30x10^{11}$	11.1139
18	5,53 ± 0.0000	14,75 ± 1,4849	$1,23x10^{12}$	12,0899
24	4,93 ± 0,0058	15,3 ± 0,4243	$1,26x10^7$	7,1004

Kontrol (+) Ciprofloxacin 2 ppm : diameter zona 20,6 mm ± 0,2828
Kontrol (-) : - (tidak memberikan respon)

Proses fermentasi dapat memberikan energi untuk pertumbuhan mikroba

serta didukung adanya nutrisi lain yang merupakan komponen susu. Akibatnya, durasi proses fermentasi juga akan mempengaruhi jumlah mikroba yang terbentuk. Penggunaan sediaan probiotik mensyaratkan jumlah koloni hidup dalam sediaan saat dikonsumsi, sehingga memenuhi persyaratan aktivitas ketika sampai pada sel target. Gambar 1 menunjukkan bahwa jumlah mikroba hidup pada jam ke-0 sampai jam ke-18 terus mengalami peningkatan. Pada jam ke-18 jumlah mikroba tertinggi berdasarkan perhitungan ALT mencapai $1,23x10^{12}$ cfu/mL kaldu fermentasi. Setelah jam ke-18 jumlah mikroba mengalami penurunan sampai jam ke-24 mencapai $1,26x10^{7}$ cfu/mL. Penurunan jumlah sel *Lactobacillus acidhopillus* dapat disebabkan oleh adanya akumulasi jumlah asam laktat, asam asetat, dan produk asam lainnya, yang menyebabkan penurunan pH (Donkor *et al*., 2006). Dalam bentuk senyawa tunggal, baik asam laktat maupun asam asetat sering digunakan sebagai preservatif. Disebutkan pula bahwa bakteri asam laktat menghasilkan sejumlah senyawa antimikroba yang terdiri dari asam laktat, H_2O_2, diasetil dan bakteriosin (Mortvedt *et al*., 1991), yaitu senyawa yang disintesis pada ribosom oleh bakteri (Gram positif maupun Gram negatif) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain (Vesterfund dan Ouwehand, 2004).



Gambar 1. Grafik hubungan antara waktu fermentasi dengan pH, diameter zona hambat (mm), dan Log ALT.

Bakteri asam laktat yang memproduksi bakteriosin bersifat sebagai bakterisidal

terbukti sangat bermafaat untuk mengembangkan keamanan produk fermentasi pangan. Sampai saat ini baru ditemukan satu bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat, yaitu nisin yang banyak digunakan pada produk pangan. *Lactobacillus acidhopillus* dapat memproduksi bakteriosin yakni Acido-philucin A. Efek antimikroba *Lactobacillus acidopillus* dapat disebabkan oleh aktivitas bakteriosin yang dihasilkan serta adanya kompetisi mikroba dengan bakteri lain.



Gambar 2. Hasil pengamatan daya hambat susu hasil fermentasi *Lactobacillus acidhopillus* terhadap *Salmonella thypimurium* pada jam ke- 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 dengan pembanding ciprofloxac in 2 ppm (↘)

Berdasarkan hasil pengamatan daya hambat sampel susu fermentasi tiap tiga jam yang diuji terhadap *Salmonella thypimurium*, menunjukkan hasil positif mulai jam ke 12 (Gambar 2). Diameter zona yang menyatakan aktivitas hambatan terbesar didapatkan pada jam ke-24, saat jumlah koloni sel mencapai $1{,}26 \times 10^7$cfu/mL dengan nilai pH 4,93.

Menurut Krasaekoopt *et al* (2003), untuk efektivitas penggunaan produk probiotik, pada 10^6–10^7 CFU/g produk per hari secara umum sudah dapat diterima. Fakta ini menjelaskan adanya produksi asam dan/atau senyawa lain seperti bakteriosin paling tinggi pada jam ke-24, walaupun tidak linear dengan jumlah sel mikroba probiotik yang memasuki fase *decline,* sehingga menurun pada jam ke-24. Korelasi antara produksi metabolit dan biomassa yang mengikuti pola *non-associated* dapat dijadikan referensi ketika

membuat formula sediaan susu probiotik, khususnya dengan *Lactobacillus acidophilus.*

Hasil penelitian ini sangat bermanfaat terutama telah berhasil menemukan profil korelasi antara produksi biomassa dan metabolit yang aktif sebagai anti bakteri khususnya *Salmonella thypimurium*, yang tentunya dapat dijadikan referensi ketika akan dilakukan produksi skala pilot atau skala komersial. Manfaat lain dapat diimplemntasikan ketika dilakukan isolasi bakteriosin atau senyawa lain sebagai molekul bio-aktif. Salah satu kelebihan bakteriosin dibandingkan antibiotik adalah efek samping atau toksisitasnya relatif lebih rendah, karena diperoleh dari mikroba yang merupakan flora normal, sehingga diharapkan dapat menggantikan fungsi antibiotik.

Isu strategis yang dapat dikembangkan dari hasil penelitian ini adalah isolasi senyawa aktif dari *Lactobacillus acidopillus* berdasarkan kondisi optimal yang telah berhasil ditemukan.

KESIMPULAN

Susu hasil fermentasi mikroba probiotik *Lactobacillus acidopillus* menunjukkan daya hambat terhadap pertumbuhan *Salmonella thypimurium* tertinggi pada jam ke 24. Viabilitas sel mikroba probiotik mencapai jumlah $1{,}26 \times 10^7$ cfu/mL kaldu fermentasi pada jam ke-24, sehingga merupakan persyaratan minimal yang harus dipenuhi untuk menghasilkan aktivitas. Selain informasi tentang jumlah sel dan durasi proses fermentasi, pH optimal untuk menghasilkan aktivitas tertinggi adalah 4,93.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima Kasih kami sampaikan kepada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah menyediakan sarana dan prasarana serta fasilitas, sehingga program ini dapat berjalan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

Anal, A. K. and Singh, H., (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics forindustrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology* 18, pp 240-251.

Chen, M.J., Chen, K.N., (2007) Applications of probiotic encapsulation in dairyproducts. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), *Encapsulation and Controlled ReleaseTechnologies in Food Systems.* Wiley-Blackwell, USA, pp 83–107.

Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N.P., (2006) Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal* 16, pp 1181–1189.

Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U., (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition,* 73 (2 Suppl.), 365S–373S.

Huis in't Veld, J. H. J., a Havenaar, R. (1991) *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 51, pp 562–567.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13 (1), pp 3–13.

Kekkonen, R.A., Vasankari, T.J., Vuorimaa, T., Haahtela, T., Julkunen, I., Korpela, R., (2007) The effect of probiotics on respiratory infections and gastrointestinal symptoms during training in marathon runners. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 17 (4), pp 352–363.

Mortvedt, C. I, J. Nissen-Meyer, K. Sletten, and I.F. Nes2, (1991) Purification and Amino Acid Sequence of Lactocin S, a Bacteriocin Produced by Lactobacillus sake L45. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (6), pp 1829-1834

Rahman, A., S. Fardiaxz, W. P., Suliantri dan C. C. Nurwitri. (1992) *Teknologi Fermentasi Susu.* Pusat Antar Universitas. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Robinson, R. K., A. Y. Tamime dan M. Wszolek (1981) Microbiology of fermented milks. Dalam : R. K. Robinson (ed). *Dairy Microbiology Handbook* : The Microbiology of milk and milk products. John wiley & sons, Inc. New York

Vasterlund, S. Dan A.C Ouwehand. (2004) Antimicrobial Components Form Lactic Acid Bacteria. New York.

Snydman, D. R., (2008) The safety of probiotics. *Clinical Infectious Disease*, 46, pp 104–111.

Xiaodong Pan, Fenqin Chen, Tianxing Wu, Honggang Tang, Zhanyu Zhao, (2009) The acid, bile tolerance and antimicrobial property of Lactobacillus acidophilus NIT. *Food Control*, 20, pp 598–602.