

ISOLASI DAN SELEKSI *Lactobacillus* YANG BERPOTENSI SEBAGAI AGENSIA PROBIOTIK

ISOLATION AND SELECTION OF *Lactobacillus* POTENTIAL FOR PROBIOTIC AGENT

Siti Nur Purwandhani¹ dan Endang S. Rahayu^{2*}

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are important in food fermentation, in producing antimicrobial substances responsible for food preservation, and in balancing the microflora composition in gastrointestinal tract which contributing many healthful benefits (as probiotic agent). Disturbance due to pathogenic bacteria colonization in intestine as well as sterilisation of intestine due to antibiotic ingestion can be overcome by consumption of probiotic lactic acid bacteria.

The objective of this study was to isolate *Lactobacillus* which potential for probiotic agent from intestinal material of healthy infant baby. Isolation was conducted using peptone glucose yeast extract media added with 0,2 % oxgall at pH 5, followed by incubation at 37 °C for 48 hr. Identifications were carried out based on Gram, morphological, biochemical and physiological characters, peptidoglycan types and protein profile on SDS-PAGE. Selection of probiotic agents were on based their antagonisms toward pathogenic bacteria, their resistance to antibiotics, and their survival at different oxygen availabilities.

Based on morphological, biochemical and physiological characters among 12 lactobacilli strains obtained during isolation, 8 of them were identified as *Lactobacillus acidophilus* and the rest as *Lactobacillus reuteri*. However based on protein profile, *L. acidophilus* group has two different profiles, the first, consist of 7 strains and the second, consists of one strain. All isolates inhibited the growth of pathogenic bacteria including *Shigella* sp., *Escherichia coli* sp., *Escherichia coli* FNCC 0091, *Proteus* sp., *Salmonella choleraesuis* JCM 3919, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Vibrio parahaemolyticus* JCM 2147, *Bacillus cereus* ATCC 0057 and *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, as shown by the inhibition zone ranging from 0,5-8 mm. Eight isolates of *L. acidophilus* were not resistant to antibiotics tested, while 3 isolates of *L. reuteri* were not resistant to chloramphenicol, rifampin and ampicillin, however they were resistant to tetracycline and elkosin. At reduced oxygen and anaerobic conditions all the isolates grew well, but at aerobic condition the growth was relatively slow. Strains of *Lactobacillus acidophilus* could be used for probiotic agents.

Key word : *Lactobacillus*, probiotic, and isolation & selection

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat dikenal memiliki peranan penting pada kehidupan manusia, karena keterlibatannya di dalam berbagai makanan fermentasi (Rahayu *et al.*, 1996) maupun keberadaannya di jalur intestin. Kemampuan bakteri ini untuk tumbuh di jalur intestin dapat digunakan untuk menjaga keseimbangan mikroflora intestin, sehingga tubuh tidak mudah terserang infeksi patogen interik. Potensi inilah yang menjadi latar belakang bakteri asam laktat, khususnya *Lactobacillus* digunakan sebagai agensia probiotik (Ray, 1996; Gilliland, 1989 dan Fuller, 1989).

Probiotik merupakan istilah yang pertama kali dicetuskan oleh Lilly dan Stilwell pada tahun 1965, untuk menyatakan efek stimulasi pertumbuhan dari suatu organisme terhadap organisme yang lain. Kemudian definisi probiotik berkembang sebagai suplemen pakan yang berisi sel mikroorganisme hidup yang digunakan untuk memperbaiki keseimbangan mikroflora di dalam jalur intestin. Saat ini probiotik lebih diartikan sebagai konsumsi biomassa hidup sebagai aditif makanan untuk tujuan kesehatan (Hoover, 1993; Hull, *et al.*, 1992 dan Speck *et al.*, 1993). Beberapa strain bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai agensia probiotik adalah *Lactobacillus acidophilus*, *L. reuteri*, dan *L. casei* demikian pula strain dari *Bifidobacterium*, karena bakteri ini memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen enterik. *Lactobacillus acidophilus*, *L. reuteri* dan *Bifidobacterium* mempunyai kelebihan karena bakteri ini merupakan mikroflora alami jalur pencernaan sehingga memiliki kemampuan untuk tumbuh di jalur ini (Hughes & Hoover, 1991; Ishibashi & Shimamura, 1993 dan Drasar & Barrow, 1985).

Beberapa persyaratan yang diperlukan untuk menjadikan strain bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik adalah bahwa strain tersebut merupakan mikroflora alami jalur pencernaan manusia, tumbuh dan tetap hidup pada makanan sebelum dikonsumsi, tetap hidup walaupun melewati jalur pencernaan, memiliki resistensi terhadap asam lambung, beberapa antibiotik, terhadap lisosin; dapat tumbuh pada intestin dan memiliki kemampuan menempel pada sel epitel intestin manusia, memberikan efek yang menguntungkan pada usus, memproduksi asam dalam jumlah besar dan cepat, mampu menghasilkan komponen antimikrobia lain disamping asam (bakteriosin, hidrogen peroksida, diasetil dan reuterin) yang efektif menghambat bakteri lain yang tidak dikehendaki, khususnya bakteri patogen (Havenaar and Huis in't Veld, 1992).

¹ Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Widya Mataram, Yogyakarta

² Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada

* Kontak person untuk informasi lebih lanjut : endangyk@yogya.wasantara.net.id

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat *Lactobacillus* yang memiliki potensi untuk digunakan sebagai agensia probiotik. Tujuan khusus meliputi isolasi *Lactobacillus* dari material instestin bayi ASI sehat, identifikasi dan pengujian kemampuan isolat *Lactobacillus* yang diperoleh sebagai agensia probiotik. Pada penelitian kali ini akan diisolasi *Lactobacillus* dari feses bayi sehat yang minum ASI (air susu ibu). Diperkirakan *Lactobacillus* pada instestin bayi yang minum ASI berjumlah sepuluh kali lebih banyak dibanding bayi yang minum susu botol (Mitsuoka, 1989).

CARA PENELITIAN

Sampel

Sampel yang digunakan sebagai sumber *Lactobacillus* adalah feses dari bayi sehat berbagai umur (5-60 hari) yang minum ASI yang dilahirkan di klinik bersalin yaitu Pura Rahardja (KB-PR) dan klinik Bidan Ibu Suharni (KB-BS) serta rumah sakit Sardjito (RS-S) dan Panti Rapih (RS-PR).

Bakteri

Kultur *Lactobacillus* yang digunakan sebagai referensi adalah *Lactobacillus acidophilus* BRLA 46 dan BRLA 5 (sumber manusia), *L. acidophilus* BRLA 7 (sumber hewan sapi), ketiganya diperoleh dari koleksi Bibek Ray, University of Wyoming USA. Kultur bakteri patogen yang digunakan adalah *Salmonella choleraesuis* JCM 3919, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047, *Escherichia coli* FNCC 0091, *Vibrio parahaemolyticus* JCM 2147, *Bacillus cereus* ATCC 0057, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, yang diperoleh dari Food & Nutrition Culture Collection (FNCC), Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM. Sedang *Escherichia coli* (1, 2, 3, 4), *Proteus* sp. dan *Shigella* sp. (1, 2, 3) diperoleh dari Fakultas Kedokteran Umum UGM.

Media dan bahan kimia

Media utama yang digunakan adalah pepton, glukosa dan yeast ekstrak (PGY). Bahan kimia pendukung adalah bile salt (Oxoid), oxgall (Difco), CaCO₃, (Merck), sikloheksimid (Wako), sodium azida (Wako), cat Gram, H₂O₂, gliserol (Merck) dan skim milk, NaOH, HCl, indikator BTB dan NR, 20 macam sumber karbon, bahan untuk analisa TLC dan bahan untuk analisis SDS- PAGE.

Antibiotik

Antibiotik yang digunakan untuk menguji resistensi *Lactobacillus* terhadap komponen ini adalah kloramfenikol, ampisilin, tetrasiklin dari Kimia Farma, elkosin (Ciba) dan rifampisin (Pharos).

Isolasi *Lactobacillus*

Metoda yang digunakan untuk isolasi adalah metoda pengenceran yang dilanjutkan dengan plating secara pour plate. Media yang digunakan untuk isolasi adalah PGY ditambah 0,1 % CaCO₃, 0,2 % oxgall, sikloheksimid dan sodium azida, dengan pH 5, inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 48 jam. Pemilihan isolat yang diduga sebagai

Lactobacillus didasarkan pada pembentuk zona jernih disekitar koloni, sel Gram positif, bentuk batang, katalase negatif. Penyimpanan kultur dilakukan dengan cara mencampur pelet biomassa (yang diperoleh dari sentrifugasi kultur berumur 24 jam) dengan gliserol 20% dan susu skim 10% pada suhu -40°C.

Identifikasi *Lactobacillus*

Identifikasi isolat *Lactobacillus* didasarkan pada bentuk sel batang, pengecatan Gram positif, non motil, katalase negatif, tidak membentuk dekstran, kemampuan pembentukan asam dari beberapa sumber karbon, kemampuan tumbuh pada berbagai pH maupun suhu, model fermentasi glukosa (homofermentatif), tipe peptidoglikan pada dinding sel (tidak memiliki asam diamino pimelat/DAP) (Rahayu dan Margino, 1986; Sneath *et al.*, 1986) serta profil protein total bakteri menggunakan SDS-PAGE (sodium dodesilsulfat poliakrilamid gel elektroforesis).

Uji aktivitas antibakteri terhadap patogen enterik

Metoda yang digunakan adalah metoda difusi agar. Uji aktivitas antibakteri ini dilakukan pada kultur bakteri maupun pada supernatan netralnya. Cara pengujian dilakukan dengan sumuran, yaitu dengan meneteskan kultur maupun supernatan netral pada sumuran yang diletakkan di tengah cawan Petri yang sebelumnya telah dituangi dengan media yang diinokulasi bakteri patogen. Kemampuan penghambatan terhadap bakteri patogen ditunjukkan dengan munculnya zona jernih disekeliling sumuran (Davidson dan Parish, 1989).

Uji resistensi terhadap antibiotika

Metoda yang digunakan untuk uji resistensi isolat *Lactobacillus* terhadap berbagai antibiotik (ampisilin, kloramfenikol, tetrasiklin, rifampisin dan elkosin) adalah difusi agar. Cara pengujian dilakukan dengan sumuran, yaitu dengan meneteskan berbagai konsentrasi antibiotik pada sumuran-sumuran yang diletakkan di tengah cawan Petri yang sebelumnya telah dituangi dengan media yang diinokulasi dengan *Lactobacillus*. Penghambatan antibiotik ditunjukkan dengan munculnya zona jernih disekeliling sumuran (Davidson dan Parish, 1989).

Kemampuan tumbuh pada beberapa kondisi oksigen

Pengujian kemampuan tumbuh pada beberapa kondisi oksigen dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada kondisi anaerob, aerob dan oksigen yang dikurangi. Kemampuan tumbuh diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan identifikasi *Lactobacillus*

Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi *Lactobacillus* dari 16 sampel feses bayi berbagai umur, namun ternyata *Lactobacillus* hanya dapat diisolasi dari feses bayi responden yang sehat minum air susu ibu yang telah berusia 30 - 60 hari. Jumlah seluruh isolat *Lactobacillus* yang berhasil diisolasi adalah 11 dengan rincian dari Bayi no - 4 diperoleh 4 isolat (SNP 8, SNP

9, SNP 10, dan SNP 11), dari Bayi no – 5 diperoleh 4 isolat (SNP 4, SNP 5, SNP 6 dan SNP 7), dan dari Bayi no – 6 diperoleh 3 isolat (SNP 1, SNP 2 dan SNP 3). Data lengkap hasil isolasi disajikan pada Tabel 1.

Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti Jepang (Mitsuoka, 1989), yang menyatakan bahwa feses bayi usia 3 hari sudah terdapat bakteri *Lactobacillus* dan pada usia 5 hari jumlahnya mencapai 10^7 , dan jumlah ini cenderung konstan sampai dewasa. Namun pada penelitian ini, *Lactobacillus* tidak berhasil diisolasi dari 6 sampel feses bayi umur 5 – 8 hari. Mikroflora saluran intestin bayi sangat ditentukan oleh lingkungan setempat sejak bayi dilahirkan dan dibesarkan, demikian pula dari kebiasaan hidup atau makan. Mitsuoka (1989) juga menyebutkan bahwa mikroflora saluran intestin bayi, khususnya bakteri yang mendominasi menunjukkan perbedaan pada bayi yang dilahirkan di lingkungan atau rumah sakit yang berbeda. Dari hasil penelitian ini juga nampak bahwa *Lactobacillus* yang diisolasi dari feses kedua bayi yang dilahirkan di klinik bersalin yang sama (KB – BS) memiliki kesamaan karakter, dan karakter ini ternyata berbeda dengan *Lactobacillus* yang berhasil diisolasi dari klinik bersalin yang berbeda (KB – PR). Bayi yang dilahirkan dari lingkungan yang sama ternyata dapat diisolasi *Lactobacillus* dengan karakter yang sama yang diperkirakan dari spesies yang sama.

Dari Tabel 1, diketahui bahwa isolat yang mendominasi bayi berumur 5 – 8 hari adalah bakteri berbentuk bulat yang diduga adalah *enterococci* walaupun identifikasi lebih lanjut perlu dilakukan. Dugaan ini didasarkan pada laporan Mitsuoka (1989) bahwa mikroflora bayi berumur kurang dari 5 hari akan didominasi oleh *coliform* dan *enterococci*.

Berdasarkan hasil pengujian morfologi, biokimiawi, fisiologi, tipe fermentasi serta tipe peptidoglikan *lactobacilli* yang diperoleh (Tabel 2), dapat disimpulkan bahwa 8 isolat yang dikelompokkan ke dalam Grup I diduga sebagai *Lactobacillus acidophilus* (SNP – 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8) dan 3 isolat yang masuk ke dalam Grup II sebagai *L. reuteri* (SNP – 9, 10 dan 11). Hasil identifikasi ini juga didukung oleh profil protein dari hasil pengujian elektroforesis menggunakan SDS-PAGE (data tidak ditampilkan). Sebelas (11) isolat yang diperoleh berdasarkan profil proteinnya dapat dibagi menjadi 3 (tiga) kelompok. Pertama terdiri dari SNP – 1, 2,3,4,5,7, yang didasarkan pada sifat-sifat seperti disajikan pada Tabel 2 masuk ke dalam Grup I yang diidentifikasi sebagai *L. acidophilus*. Kelompok kedua terdiri dari SNP – 9,10 dan 11 yang diidentifikasi sebagai *L. reuteri*. Sedangkan SNP 8 yang juga diduga sebagai *L. acidophilus*, ternyata memiliki profil yang berbeda dengan isolat *L. acidophilus* yang lain, didasarkan pada bentuk sel-nya SNP – 8 ini juga jauh lebih panjang dibandingkan dengan yang lainnya. Isolat SNP 8 ini adalah *Lactobacillus* yang diisolasi dari bayi yang dilahirkan dari klinik bersalin yang berbeda dengan 7 isolat *Lactobacilli* yang lain yang diisolasi dari feses 2 bayi tapi dilahirkan pada klinik yang sama. Hal ini mendukung dugaan bahwa mikroflora intestin bayi yang dilahirkan pada klinik yang sama memiliki kesamaan yang lebih tinggi.

Tabel 1. Data of *Lactobacillus* isolation

No	No. infant	Place of birth	age (day)	No. of isolates	Cell form		Gram	Catalase	LAB	Code (SNP)
					Cocci	rod				
1	B-1	KB-BS	5	15	15	0	x	x	0	
2	B-2	KB-BS	5	32	32	0	x	x	0	
3	B-3	RS-PR	5	29	29	0	x	x	0	
4	B-3	RS-PR	21	12	12	0	x	x	0	
5	B-4	KB-PR	5	60	60	0	x	x	0	
6	B-4	KB-PR	16	36	36	0	x	x	0	
7	B-4	KB-PR	30	24	17	7	+ (4) - (3)	- (4)	4	8, 9, 10, 11
8	B-5	KB-BS	10	24	24	0	x	x	0	
9	B-5	KB-BS	23	24	19	5	- (5)	x	0	
10	B-5	KB-BS	60	6	2	4	+ (4)	- (4)	4	4,5,6,7
11	B-6	KB-BS	5	24	24	0	x	x	0	
12	B-6	KB-BS	16	24			x	x	0	
13	B-6	KB-BS	31	12	9	3	+ (3) - (6)	- (3)	3	1, 2, 3
14	B-7	RS-S	8	24	24	0	x	x	0	
15	B-8	KB-PR	30	12	9	3	- (3)	x	0	
	B-9	RS	15	12	12	0	x	x	0	

x = not detected

Tabel 2. Identification of lactobacilli

Isolat	Group I	Group II	BRLA - 5	BRLA - 7	BRLA - 46	<i>L. acido- philus</i>	<i>L. reuteri</i>
	SNP 1,2,3,4, 5,6,7,8	SNP 8,9,10				dalam Bergey's Manual	dalam Bergey's Manual
Karakteristik							
Bentuk sel	Rod (long R)	Short Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Short Rod
Gram	+	+	Nd	nd	nd	+	+
Production gas	-	+	Nd	nd	nd	-	+
Katalase	-	-	Nd	nd	nd	-	-
Motilitas	-	-	Nd	nd	nd	-	-
Dekstran	-	-	Nd	nd	nd	-	-
Pertumb. 15 °C	+	-	-	+	+	-	-
Pertumb. 45 °C	+	+	+	+	+	+	+
Pertumb. pH 3,5	+	+	+	+	+	+	+
Pertumb. pH 9,0	-	-	-	-	-	-	-
Tipe DAP	NonDAP	NonDAP	Nd	nd	nd	NonDAP	NonDAP
Asam dari							
Karbon							
Arabinosa	-	+	-	-	-	-	+
Selobiosa	+	-	+	+	+	+	-
Fruktosa	+	+	+	+	+	+	+
Galaktosa	+	+	+	+	+	+	+
Glukosa	+	+	+	+	+	+	+
Glukonat	-	-	-	-	-	-	+
Laktosa	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	-	+	-	+	-	-
Manosa	+	+	+	+	+	+	-
Melibiosa	-	+	-	-	+	-	+
Melezitosa	+	-	+	-	+	d	-
Rafinosa	-	+	-	+	+	d	+
Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-
Ribosa	+(1-)	+	+	-	+	-	+
Salisin	+	-	+	+	+	+	-
Sorbitol	+(1-)	-	+	-	+	-	-
Pati	+/-	-	-	+	-	+/-	d
Sukrosa	+	+	+	+	+	+	+
Trehalosa	+	+	+	+	+	d	-
Xylosa	-	+	-	-	-	-	-
(Dugaan) spesies	<i>L. acido- philus</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. acido- philus</i>	<i>L. acido- philus</i>	<i>L. acido- philus</i>		

Nd = tidak dideteksi

d = 11-89% positif

Antagonisme terhadap bakteri patogen

Antagonisme lactobacilli terhadap bakteri patogen enterik dinyatakan dalam zona penghambatan dalam milimeter (mm) yang diukur dari pinggiran sumuran sampai lingkaran terluar zona jernih pada uji dengan metoda difusi. Contoh terbentuknya zona jernih akibat penghambatan oleh kultur *Lactobacillus* terhadap bakteri patogen *E. coli* dan *Salmonella* disajikan pada Gambar 1 dan 2, sedang penghambatan oleh supernatan netral pada *E. coli* disajikan pada Gambar 3. Hasil pengujian aktivitas penghambatan kultur lactobacilli terhadap bakteri patogen maupun pembusuk, baik yang Gram negatif ataupun positif disajikan pada Tabel 3.

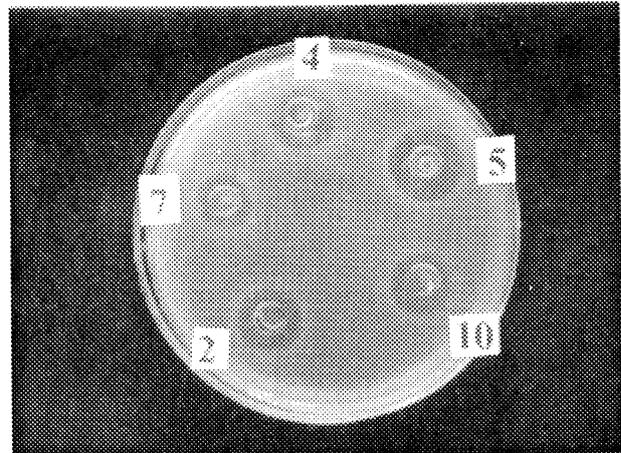
Dari hasil pengujian tersebut terlihat bahwa pada umumnya aktivitas penghambatan kultur lactobacilli terhadap bakteri patogen lebih besar dibanding dengan aktivitas penghambatan oleh supernatan netralnya. Hal ini terjadi disebabkan karena aktivitas kultur bakteri asam laktat sebagai penghambat bakteri patogen didukung oleh asam dan komponen-komponen metabolit yang dihasilkannya, sedangkan aktivitas supernatan netralnya hanya didukung oleh komponen-komponen metabolit saja. Menurut Daeschel (1989), asam yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat mempunyai efek antimikrobia terhadap bakteri patogen enterik. Selain menghasilkan asam, bakteri asam laktat juga memproduksi senyawa-senyawa penghambat lain yaitu diasetil dan hidrogen peroksida, dan beberapa strain menghasilkan bakteriosin.

Dari Tabel 3 diperoleh kesimpulan bahwa delapan isolat yang diidentifikasi sebagai *L. acidophilus* (SNP – 1,2,3,4,5,6,7,8) memiliki kemampuan menghambat bakteri patogen lebih efektif dibanding dengan ketiga isolat (SNP – 9,10,11) yang diidentifikasi sebagai *L. reuteri*, baik dalam bentuk kultur yang mencerminkan komponen utama asam organik ataupun supernatan yang telah dinetralkan. Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Gilliland (1989) dan Earnshaw (1996) bahwa *L. acidophilus* mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri-bakteri patogen.

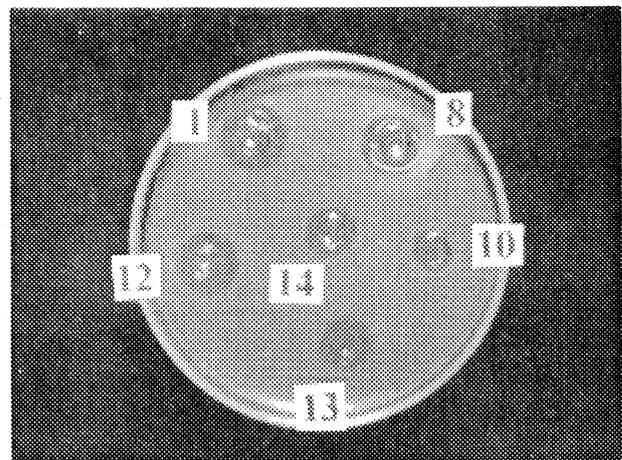
Antibakteri yang dihasilkan oleh *L. acidophilus* lebih sensitif terhadap *Vibrio*, *Shigella*, dan *E. coli* dengan rata-rata zona jernih sekitar 4 – 5 mm (untuk kultur) dan 2 – 3 mm (untuk supernatan netral). *Proteus*, *Salmonella* dan beberapa Gram positif (*Staphylococcus*, *Listeria* dan *Bacillus*) ternyata lebih resisten terhadap antimikrobia ini, ditunjukkan dengan zona jernih yang hanya berkisar antara 2 – 3 mm (untuk kultur) dan sekitar 1 mm untuk supernatan. Bahkan kelompok bakteri Gram positif yang diuji pada umumnya tidak dihambat oleh supernatan netral dari 11 isolat *L. acidophilus*.

Antibakteri yang dimiliki oleh bakteri asam laktat pada umumnya terdiri dari asam laktat, hidrogen peroksida, diasetil atau bakteriosin. Pada penelitian ini dilakukan pengujian dengan 2 cara sekaligus, pertama adalah menggunakan kultur umur 1 hari yang langsung digunakan sebagai uji antimikrobia. Kultur ini pada umumnya memiliki komponen antimikrobia utama yaitu asam laktat. Pada pengujian yang lain yaitu menggunakan supernatan,

antibakteri diduga merupakan komponen hidrogen peroksida, diasetil ataupun bakteriosin, walaupun uji lebih lanjut untuk menentukan jenis komponen ini perlu dilakukan.



Gambar 1. Inhibition of *Lactobacillus* cultures to the growth of *Salmonella choleraesuis* JCM 3919 (4=SNP4, 5=SNP5, 10=SNP10, 2=SNP2, 7=SNP7)



Gambar 2. Inhibition of *Lactobacillus* neutral supernatant to the growth of *Escherichia coli* FNCC 0091 (1=SNP1, 8=SNP8, 10=SNP10,13=LABR 7, 12=LABR5, 14=LABR46)

Tabel 3. Inhibition of culture (A) and neutral supernatant (B) of *Lactobacillus* to the growth of pathogenic bacteria

	SN P 1	SN P 2	SN P 3	SN P 4	SN P 5	SN P 6	SN P 7	SN P 8	SN P 9	SN P 10	SN P 11	BR LA 5	BR LA 7	BR LA 46
<i>Proteus</i>	2-A	3	3	2	2	2	3	1	1	1	1	1	0	3
	2-B	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	0	0
<i>S. choleraesuis</i>	3	3	3	3	4	3	2	2	4	2	2	1	0	4
JMC 3919	0	0	0	0	2	1	0	3	2	2	0	2	0	0
<i>V parahaemolyticus</i> JCM 2147	6	4	4	5	5	5	6	2	2	1	1	0	0	2
<i>Shigella</i> 1	2	0	2	1	1	1	2	2	2	2	2	0	0	0
	5	5	5	5	3	3	4	1,5	1	2	3	2	0	2
	2	4	1,5	1	4	4	2	2	0	0,5	1	3,5	2	2
<i>Shigella</i> 2	7	7	8	6	7	7	5	5	4,5	3	4	4,5	4	5,5
	4	3	5	2	2	1,5	2	6	4,5	3	3	6	4	6
<i>Shigella</i> 3	4	2,5	3,5	4	4	3,5	2	3	2	2	3	1,5	3,5	3
	2	3	0	2	2	1,5	1	3	0,5	3	0	4	3,5	0
<i>E.coli</i> 1	5	6	5	5	5	5	5	3	3	1	4	2,5	2,5	4
	4	1,5	0	0,5	0,5	1	3,5	4	2	4	2	0	2,5	1
<i>E.coli</i> 2	5	4,5	5	4,5	5	5	4	4	2	2	2	2	2	2
	2	1,5	2	2	2	1,5	1	3	0,5	0,5	0	3,5	3	2,5
<i>E.coli</i> 3	4	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3	3,5	3,5	1	3	1,5	1,5	3,5
	2	2,5	1,5	1	1	1	3,5	2,5	1	1	0	0	2,5	0
<i>E.coli</i> 4	4	5	4	5	5	5	3	2	2	0,5	3	3	3	0
	0,5	1,5	4	0	0	2	2,5	0	0	0	1	0	0	0
<i>E.coli</i> FNCC 0091	4	3,5	3	3	3	3	3	3	2	2	3	2	2	1
	4,5	0	4,5	3	1,5	0	0	4	0	1	0	3,5	2,5	2
<i>S. aureus</i> FNCC 0047	2	3	3	3	3	2	2	1	2	1	1	3	2	3
	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	1,5	2	3	3	5	3	2	1	1	1	1	1,5	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 0057	1,5	1,5	3,5	2,5	4	3,5	2	1	1,5	2	1	2,5	1,5	1,5
	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan : Penghambatan dinyatakan dalam mm yang diukur dari pinggiran sumuran sampai luar zona jernih.

Pengujian resistensi isolat terhadap antibiotik

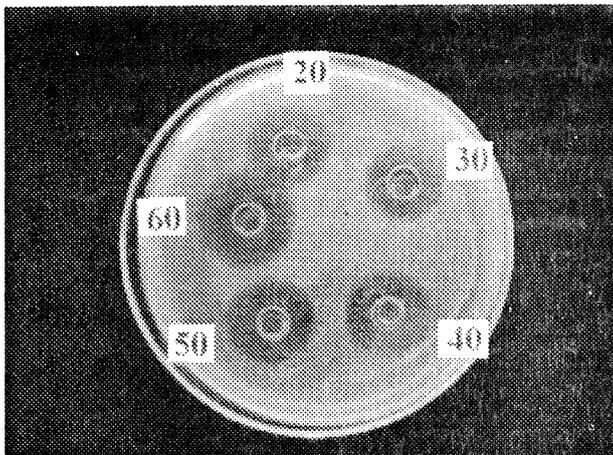
Deteksi konsentrasi penghambatan minimum sejumlah antibiotik pada masing-masing isolat disajikan

pada Tabel 4, sedang penghambatan antibiotik rifampisin terhadap *Lactobacillus* SNP 10 dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.

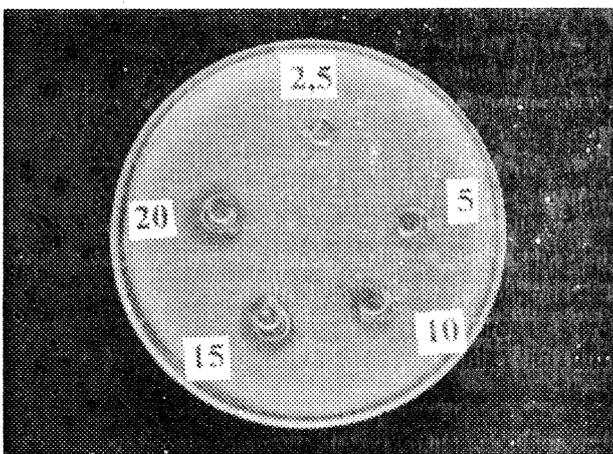
Tabel 4. Minimum inhibition concentration of antibiotic to the growth of *Lactobacillus*

Isolate	Minimum inhibition concentration (ppm)				
	Tetrasiklin	Ampisilin	Kloramfenikol-Nikol	Elkosin	Rifampisin
SNP 1	10	20	30	20	5
SNP 2	15	20	20	60	2,5
SNP 3	15	20	20	60	2,5
SNP 4	30	20	30	20	2,5
SNP 5	30	20	30	20	2,5
SNP 6	15	30	10	20	5
SNP 7	40	15	30	60	10
SNP 8	50	30	30	60	5
SNP 9	150	10	20	60	5
SNP 10	150	30	20	75	10
SNP 11	150	30	20	75	10
BRLA 5	2,5	10	10	10	10
BRLA 7	20	10	10	75	10
BRLA 4	40	30	10	75	10

Berdasar data Tabel 4 terlihat bahwa isolat yang diduga *L. acidophilus* peka terhadap semua antibiotik yang diujikan, sedang isolat yang diduga *L. reuteri* peka terhadap rifampisin, kloramfenikol dan ampisilin; akan tetapi kurang peka terhadap elkosin dan tetrasiklin. Menurut penelitian Johnson *et al.*, (1987), *L. acidophilus* peka terhadap ampisilin 10 µg dan rifampin 5 µg, sedang terhadap tetrasiklin 5 µg ada sebagian yang peka dan sebagian tidak peka. Pada penelitian yang dilakukan jumlah ampisilin yang mulai menghambat pertumbuhan isolat yang diduga *L. acidophilus* adalah 0,75 - 1,5 µg, sedang rifampisin pada konsentrasi 0,125 - 0,50 µg, dan tetrasiklin 0,75 - 2 µg. Perbedaan kepekaan isolat terhadap antibiotik ini disebabkan karena komposisi dinding dan membran sel masing-masing isolat yang tidak sama (Franklin dan Snow, 1981; Kucer dan Bennett, 1987). Dengan diketahuinya konsentrasi penghambatan minimum antibiotik terhadap isolat yang diuji, maka dapat digunakan sebagai standar apabila isolat yang bersangkutan digunakan sebagai agensia probiotik setelah terapi antibiotik, yaitu dengan mempertimbangkan residu antibiotik di intestin dan konsentrasi penghambatan minimum antibiotik terhadap isolat yang bersangkutan.



Gambar 3. Inhibitorin of rimpisin to the growth of SNP 10 at concentration of 20, 30, 40, 50 and 60 ppm



Gambar 4. Minimum inhibitorin of rifampin to the growth of SNP 10 (at 10 ppm)

Kemampuan tumbuh dalam media aerob, anaerob dan oksigen yang dikurangi

Hasil pengujian ini menunjukkan bahwa isolat-isolat yang diperoleh dapat tumbuh pada berbagai kondisi, akan tetapi semua isolat baik yang diduga *L. acidophilus* maupun *L. reuteri* lebih sesuai untuk ditumbuhkan pada kondisi anaerob dan oksigen yang dikurangi dibandingkan apabila ditumbuhkan pada kondisi aerob. Hal ini disebabkan karena *L. acidophilus* maupun *L. reuteri* merupakan bakteri indigenous yang bersifat mikroaerotolerant.

KESIMPULAN

Lactobacillus hanya berhasil diisolasi dari feses bayi responden yang berusia 30 - 60 hari.

Berdasar pengujian biokimiawi, tipe fermentasi dan profil protein dari 11 isolat *Lactobacillus* yang berhasil diisolasi, 8 isolat diidentifikasi sebagai *L. acidophilus* dan 3 isolat sebagai *L. reuteri*.

Berdasar kemampuan isolat untuk tumbuh pada media yang mengandung oxgall 0,2% dengan kondisi asam, dan kemampuannya menghambat bakteri patogen serta kemampuannya tumbuh pada berbagai kondisi oksigen, maka 8 isolat *L. acidophilus* diduga memiliki potensi untuk digunakan sebagai agensia probiotik.

DAFTAR PUSTAKA

- Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial Substances from Lactic Acid Bacteria for Use as Food Preservatives. *Food Technol.* 43 (1) : 164-167
- Davidson, P. M. dan M. E. Parish. 1989. Methods for Testing the Efficacy of Food Antimicrobials. *Food Technol.* 43 (1) : 148-155
- Drasar, B. S. and P. A. Barrow. 1985. *Intestinal Microbiology*. American Society for Microbiology.
- Earnshaw, R.G. 1996. The Antimicrobial Action of Lactic Acid Bacteria : Natural Food Preservation Systems. In *The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease*. Wood, B.J.B. (ed). Blackie Academic & Professional, London.
- Franklin, T.J. and G. A. Snow. 1981. *Biochemistry of Antimicrobial Action*. Chapman and Hall. New York.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in Man and Animal, *J. Appl. Bacteriol.* 66 : 365-378.
- Gilliland, S.E. 1989. *Acidophilus Milk Products : A Review of Potential Benefits Consumers*. *J. Dairy Sci* 72 : 2483-2494.

- Havenaar, R. and J. H. J. Huis in't Veld. 1992. Probiotics : A General View. *In* The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease. Wood , B.J.B. (ed). Blackie Academic & Professional.
- Hoover, D.G. 1993. Bifidobacteria : Activity and Potensial benefits. *J. Food Technol.* 43 (6) : 120-124.
- Hughes, D.B. and D. G. Hoover. 1991. Bifidobacteria : Their Potential for use in American Dairy Product, *Food Technol.* 45(4) : 74-83.
- Hull, R.R., P. L. Conway, and A. Evans. 1992, Probiotic Foods-A New Appportunity, *Food Australia* 44 (3) : 112-113
- Ishibasi, N. and S. Shimamura. 1993, Bifidobacteria : Research and Development in Japan, *Food Technol*, 47(6) : 126 - 134.
- Johnson, M.C., B. Ray and T. Bhowmik. 1987. Selection of *Lactobacillus acidophilus* strain for use in "acidophilus products". *Antonie van Leeuwenhoek* 53 : 215-231. Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht.
- Kucer, A. dan N. McK. Bennett. 1987. The Use of Antibiotics. William Heinemann Medical Books.London.
- Mitsuoka, T. 1989, Microbe in the Intestine Our Lifelong Partners, Yakult Honska Co., Ltd., Japan.
- Rahayu, E.S., Djafaar, T.F., Wibowo, D. and Sudarmadji, S. 1996. Lactic Acid Bacteria from Indigenous Fermented Foods and Their Antimicrobial Activity, *Journal Indonesian Food & Nutrition Progress*, Vol 3, no 2 : 21-27.
- Rahayu, E.S. dan S. Margino. 1997. Bakteri asam laktat : Isolasi dan Identifikasi. Materi Workshop, PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada.
- Ray, B. 1996. Probiotic of lactic acid bacteria : Science or myth ? *In* Lactic Acid Bacteria : Curent Advances in Metabolism, Genetic, and Application. Bozoglu, T.F. dan B. Ray (ed). NATO ASI Series, Vol. H 98. Springer-Verlag, Germany.
- Sneath P. H. A., Nicholas S. M., M. Elisabeth Sharpe and John G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. Williams & Wilkins.
- Speck, M.L., W. J. Dobrogosz and I. A. Casas. 1993. *Lactobacillus reuteri* in Food Supplementation. *Food Technol* 88 (7) : 90-94.