

TOLERANCE OF PROBIOTIC BACTERIAL CANDIDATE FROM KAKAP PUTIH ON pH AND BILE SALT

Abstract

By

Fiki Harjuni, Nursyirwani dan Aras Mulyadi

Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Riau University, Pekanbaru 28293.

The use of probiotic is one of alternatives to solve disease problem in aquaculture. This research aimed to examine tolerance of three lactic acid bacteria (KP1, KP2, and KP3) isolated from kakap putih (*Lates calcarifer*) toward pH and bile salt at different concentration. The bacterial isolates were enriched on MRS agar medium. Tolerance to pH was conducted in MRS broth at pH 3, 5 and 8. While, tolerance to bile salt were performed on MRS agar at concentration of 0, 0,1, 0,2, 0,3, and 0,4 %. Isolate KP3 at pH and incubated for 48 hours showed the highest tolerance, but the highest tolerance to bile salt was indicated by isolated KP2 at bile salt concentration of 0,3 %.

Keyword: Tolerance, probiotic, Kakap Putih, pH, Bile Salt.

PENDAHULUAN

Perairan di Provinsi Riau, khususnya Kabupaten Bengkalis dan Kepulauan Meranti sangat potensial untuk pengembangan budidaya laut. Produksi budidaya ikan kakap putih rata-rata pembudidaya keramba jaring apung Desa Sialang Pasung Kepulauan Meranti adalah 2.665,3 kg/panen.

Probiotik adalah mikroba hidup menguntungkan bagi makhluk hidup, yang bermanfaat untuk memperbaiki keseimbangan mikroba didalam saluran pencernaan (Afrianto dan Lifiawati, 2005). Penelitian tentang probiotik telah pernah dilakukan untuk peningkatan produksi akuakultur sebagai suplemen makanan, peningkatan resistensi terhadap penyakit, serta peningkatan kinerja pertumbuhan (Nayak, 2010).

Beberapa persyaratan yang diperlukan untuk pengembangan probiotik antara lain adalah antagonismenya

terhadap bakteri patogen, dan toleransi terhadap pH dan garam empedu. Bakteri calon probiotik harus mampu hidup pada kondisi asam, karena usus dan lambung ikan bersifat asam. Demikian pula terhadap kondisi usus ikan yang mempunyai konsentrasi garam empedu yang rendah.

Kebanyakan bakteri asam laktat tidak hanya tumbuh lebih lambat pada pH rendah, tetapi mungkin mengalami kerusakan dan hilangnya viabilitas jika selnya berada pada kondisi pH yang rendah. Kondisi yang sangat asam dapat mengakibatkan kerusakan membran dan lepasnya komponen intraseluler dan menyebabkan kematian.

Bakteri yang tahan asam memiliki ketahanan yang lebih besar terhadap kerusakan membran akibat penurunan pH ekstraseluler dibandingkan dengan bakteri yang tidak tahan dengan asam. Toleransi bakteri asam laktat yang cukup tinggi terhadap asam biasanya juga disebabkan

karena bakteri tersebut mampu mempertahankan pH sitoplasma lebih alkali dari pada pH ekstraseluler (Nannen dan Hutkins, 1992).

Garam empedu adalah sebuah senyawa amphipatik, salah satu sisinya dapat larut dalam air (polar/ *hydrophilic*) dan sisi yang lainnya tidak larut dalam air (nonpolar/ *hydrophobic*) (Saunders *et al.*, 2005). Struktur amphipatik inilah yang menyebabkan garam empedu mampu mengemulsifikasi lemak dan secara langsung mempengaruhi kehidupan mikroorganisme dalam saluran pencernaan khususnya ketika berada di usus halus.

Keberadaan garam empedu bagi mikroorganisme di dalam usus halus dapat juga disebut "*Biological detergents*" yaitu cairan yang memiliki kemampuan untuk melarutkan fosfolipid, kolesterol dan protein. Sebagian besar dari senyawa tersebut dapat menyusun membran sel, sehingga menyebabkan sel mikroorganisme menjadi hancur (*lysis*).

Konsentrasi garam empedu yang tinggi akan menjadi racun dan zat antimikrobia yang sangat keras (Begley *et al.*, 2002). Bezkorovainy (2001) juga menambahkan bahwa cairan empedu di dalam usus halus bersifat menghambat pertumbuhan mikrobia yang ada, oleh karena itu BAL (Bakteri Asam Laktat) khususnya *Streptococcus* yang akan dijadikan probiotik harus mampu bertahan terhadap garam empedu agar dapat hidup dan melakukan perannya ketika berada di dalam usus.

Bakteri asam laktat juga berfungsi untuk mengubah laktosa menjadi asam asetat, sehingga menurunkan pH saluran pencernaan dan secara alami mencegah kolonisasi banyak bakteri (Watson *et al.*, 2008).

Penelitian tentang antagonisme bakteri calon probiotik dari ikan kakap putih telah pernah dilakukan, antara lain

seperti yang dilakukan Afrimansyah (2015). Namun toleransi isolat bakteri tersebut terhadap pH dan garam empedu belum dilakukan. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toleransi tiga isolat (KP1, KP2 dan KP3) dari ikan kakap putih terhadap pH dan garam empedu dengan konsentrasi berbeda.

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai Februari 2016. Di Laboratorium Mikrobiologi Laut Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Riau.

Bahan yang digunakan adalah tiga isolat bakteri (KP 1, KP 2, dan KP 3) koleksi dari laboraorium mikrobiologi laut Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Riau, yang diisolasi dari ikan kakap putih. Bahan yang digunakan untuk memperbanyak bakteri calon probiotik adalah *de Mann Rogosa Sharpe* (MRS) agar dan cair (Merck, Darmstadt, Germany) pH 5,7.

Adapun bahan lain yang diperlukan untuk menguji toleransi isolat calon probiotik terhadap pH dan garam empedu ialah : Aquades, Larutan *Phospat Buffer Saline* (PBS) pH 2 sampai 6, NaCl 1%, NaOH 1 %, air laut 20⁰/₀₀, alkohol 70 %, dan garam empedu (*bilesalt*) (Merk, Oxoid).

Peralatan yang digunakan antara lain *autoclave*, *incubator*, *vortex*, spektrofotometer, pH meter, lemari pendingin dan *freezer*, *magnetic stirer*, cawan petri (*Petri disc*), pipet ukur, jarum inokulum, rak tabung, mikropipet 100 µl dan 1000 µl, lampu bunsen dan alat-alat gelas (erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, beaker gelas).

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode ekperimental. Uji toleransi isolat bakteri calon probiotik terhadap pH

dan garam empedu menggunakan rancangan acak lengkap dua faktor. Untuk memperkecil kekeliruan dilakukan tiga kali pengulangan.

Untuk pengujian toleransi isolat bakteri calon probiotik terhadap pH terdiri dari : Faktor pertama: isolat bakteri calon probiotik yang diisolasi dari ikan kakap putih yakni (KP1, KP2, dan KP3). Faktor kedua : perlakuan pH 3,5 dan 8

Untuk pengujian toleransi isolat bakteri calon probiotik terhadap Garam empedu terdiri dari : Faktor pertama: isolat bakteri calon probiotik yang diisolasi dari ikan kakap putih yakni (KP1, KP2, dan KP3). Faktor kedua : konsentrasi garam empedu 0 % untuk kontrol, 0,1, 0,2, 0,3 dan 0,4 %).

Sterilisasi bertujuan untuk menghilangkan semua mikroorganisme yang ada pada alat berupa *glassware* (tabung reaksi, petri) dan bahan berupa media agar. Alat dan bahan disterilkan menggunakan autoklaf suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit dan alat yang telah disterilkan disimpan.

Isolat bakteri yang digunakan merupakan hasil isolasi yang telah dilakukan oleh Afrimansyah (2015), yaitu isolat KP1, KP2, dan KP3. Isolat bakteri tersebut ditumbuhkan kembali dan diperbanyak pada media MRS agar dengan cara teknik isolasi goresan (*streak method*).

Isolat KP1, KP2 dan KP3 diinokulasi pada media MRS *broth* (Merck, Darmstadt, Germany) yang telah diatur pHnya sesuai pH uji yakni pH 3, 5, dan 8 dengan penambahan HCL 1 % atau NaOH 1%. Setelah semua diinokulasi, dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) dengan Spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm pada waktu inkubasi 1 jam, 24 dan 48 jam. Sebagai kontrol dan blanko digunakan MRS *broth* tanpa inokulasi bakteri.

Pengamatan dilakukan menurut prosedur yang dilakukan Buntin *et al.* (2008). Selum bakteri diinokulasi, medium MRS agar di tambahkan dengan garam empedu, masing-masing dengan konsentrasi 0 % untuk kontrol, 0,1, 0,2, 0,3, dan 0,4 %. Sementara itu isolat uji yang telah ditumbuhkan pada MRS cair, disuspensikan didalam larutan PBS. Suspensi tersebut kemudian disentrifuge pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit.

Pelet bakteri yang didapat disuspensikan kembali didalam larutan PBS sampai homogen jika suspensi masi berwarna kuning lalu disentrifuge lagi, pelet bakteri yang didapat disuspensikan didalam PBS lalu diukur OD-nya dengan panjang gelombang 620 nm.

Suspensi tersebut dibandingkan dengan *Mc Farland* nomor 1 (3×10^8 sel/ml). Suspensi kemudian diencerkan 1 : 10 dalam PBS sehingga didapatkan konsentrasi bakteri masing-masing 10^6 sel/ml dan diencerkan kembali dengan konsentrasi 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} . Masing-masing suspensi disebarakan (*Spread Plate Method*) pada media MRS agar dengan konsentrasi garam empedu 0, 0,1, 0,2, 0,3 dan 0,4 %. Pertumbuhan dan jumlah konsetrasi bakteri dihitung setelah diinkubasi selama 24-48 jam.

Data hasil pengukuran *Optical Dencity* (OD) pertumbuhan bakteri calon probiotik pada pH berbeda, dan jumlah bakteri pada konsentrasi *Bile salt* berbeda disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data kemudian dianalisis secara deskriptif.

Untuk melihat perbedaan pertumbuhan antara setiap isolat akan dilakukan uji *analisis of variance* (ANOVA) dengan pengujian toleransi isolat bakteri calon probiotik terhadap pH dan garam empedu menggunakan rancangan acak lengkap dua faktor.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Toleransi Isolat Bakteri Calon Probiotik terhadap pH

Pertumbuhan isolat bakteri calon probiotik KP1, KP2, dan KP3 pada media MRS cair dengan pH berbeda selama 1 jam, 24 dan 48 jam dapat dilihat dari nilai *Optical Density* (OD 600 nm) tanpa dikonversikan ke jumlah sel/ml, seperti yang disajikan pada Tabel 1, 2 dan 3, dan grafik pertumbuhan isolat KP1, KP2, dan KP3.

Tabel 1. Pertumbuhan isolat KP1 selama 48 jam dengan pH dan waktu pengukuran berbeda dilihat dari nilai *Optical Density* (OD 600 nm) tanpa dikonversikan ke jumlah sel/ml.

pH	Waktu inkubasi bakteri calon probiotik KP1		
	1 jam	24 jam	48 jam
3	0.291±0.026	0.359±0.116	0.326±0.033
5	0.265±0.070	0.404±0.044	0.452±0.039
8	0.338±0.044	0.068±0.071	0.153±0.074

Pada Tabel 1 terlihat bahwa pada pH 3 pertumbuhan optimal isolat KP1 terjadi pada waktu inkubasi 24 jam dan mengalami penurunan pada inkubasi ke 48 jam. Sedangkan pada pH 5 pertumbuhan bakteri mengalami kenaikan hingga waktu inkubasi 48 jam pada pH 8 pertumbuhan optimal bakteri terjadi pada inkubasi 1 jam pertama, kemudian mengalami penurunan pertumbuhan pada inkubasi 24 jam dan kembali naik pada waktu inkubasi 48 jam.

Tabel 2. Pertumbuhan isolat KP2 selama 48 jam dengan pH dan waktu pengukuran berbeda dilihat dari nilai *Optical Density* (OD 600 nm) tanpa dikonversikan ke jumlah sel/ml.

pH	Waktu inkubasi bakteri calon probiotik KP2		
	1 jam	24 jam	48 jam
3	0.262±0.031	0.308±0.011	0.289±0.017
5	0.391±0.114	0.437±0.058	0.538±0.051
8	0.337±0.042	0.073±0.068	0.133±0.059

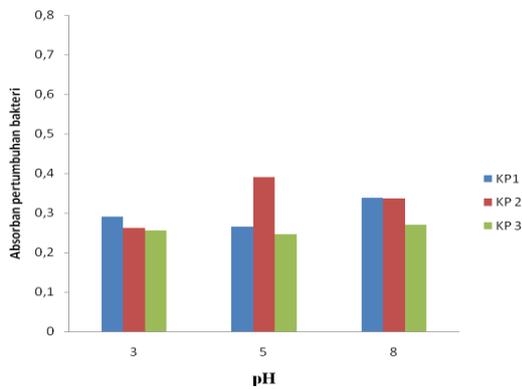
Pada Tabel 2 terlihat bahwa pada pH 3 pertumbuhan optimal isolat KP2 terjadi pada waktu inkubasi 24 jam dan mengalami penurunan pada inkubasi ke 48 jam. Sedangkan pada pH 5 pertumbuhan bakteri mengalami kenaikan hingga waktu inkubasi 48 jam. Pada pH 8 pertumbuhan bakteri terjadi pada inkubasi 1 jam pertama, kemudian mengalami penurunan pertumbuhan pada inkubasi 24 jam, dan kembali naik pada waktu inkubasi 48 jam.

Tabel 3. Pertumbuhan isolat KP3 selama 48 jam dengan pH dan waktu pengukuran berbeda dilihat dari nilai *Optical Density* (OD 600 nm) tanpa dikonversikan ke jumlah sel/ml.

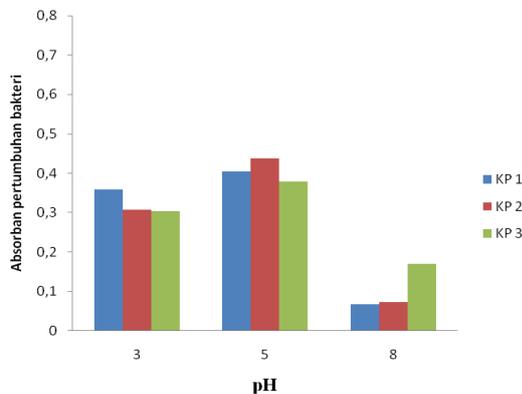
pH	Waktu inkubasi bakteri calon probiotik KP3		
	1 jam	24 jam	48 jam
3	0.255±0.072	0.303±0.031	0.370±0.053
5	0.246±0.052	0.378±0.023	0.745±0.063
8	0.270±0.031	0.170±0.069	0.243±0.031

Pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa pertumbuhan isolat KP3, pH 3 pada setiap waktu inkubasi mengalami kenaikan. Pada pH 5 pertumbuhan bakteri juga mengalami kenaikan disetiap jam. Sedangkan pada pH 8 pertumbuhan bakteri mengalami penurunan pertumbuhan dari jam 1. Untuk

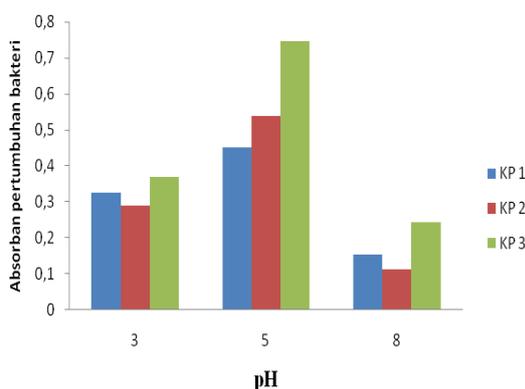
melihat perbedaan pertumbuhan tiap-tiap isolat calon probiotik secara 1 jam, 24 dan 48 jam.



(A)



(B)



(C)

Gambar 1. Jumlah rata-rata bakteri calon probiotik pada perlakuan pH berbeda pada inkubasi 1 jam (A), 24 jam (B), dan 48 jam (C).

Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa adanya perbedaan pertumbuhan tiap-tiap isolat calon probiotik pada 1 jam, 24 dan 48 jam pengamatan. Pada perlakuan pH 3, 5 dan 8 terlihat perbedaan jumlah antara isolat KP1, KP2 dan KP3. Dari uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata ($P < 0,01$).

Pada penelitian ini didapatkan bahwa ketiga isolat BAL yang diuji (KP1, KP2, dan KP3) dapat tumbuh pada pH 3, 5, dan 8. Hasil ini tidak jauh berbeda dari penemu-penemu terdahulu, salah satunya Nursyirwani (2013), mendapatkan hasil bakteri asam laktat yang diisolasi dari ikan kerapu macan bersifat resisten dan dapat hidup pada lingkungan asam. Hasil pengukuran kerapatan optik (*optical density, OD*) dari kultur cair dengan pH 3, 4, 5, dan 6 menunjukkan BAL dapat hidup dan berkembangbiak pada kisaran pH tersebut.

Pengujian ketahanan bakteri calon probiotik ini sangat penting dilakukan karena untuk mengetahui sebagai mana bakteri uji apakah dapat memenuhi syarat sebagai bakteri probiotik salah satunya apakah bakteri calon probiotik tersebut dapat bertahan pada pH asam. Berrada *et al.* (1991) menyatakan bahwa waktu yang diperlukan mulai saat bakteri masuk sampai keluar dari lambung sekitar 90 menit. Isolat yang diseleksi untuk digunakan sebagai probiotik harus mampu bertahan dalam keadaan asam lambung selama sedikitnya 90 menit.

Hasil uji ini menunjukkan pada isolat KP1 pada pH 3 pertumbuhan optimal terjadi pada waktu inkubasi 24 jam dan mengalami penurunan pada inkubasi ke 48 jam. Pada pH 5 pertumbuhan bakteri mengalami kenaikan, pH 8 pertumbuhan optimal bakteri terjadi pada inkubasi 1 jam pertama, kemudian mengalami penurunan pertumbuhan pada inkubasi 24 jam dan kembali naik pada waktu inkubasi 48 jam.

Pada isolat KP2 di pH 3 pertumbuhan optimal terjadi pada waktu inkubasi 24 jam dan mengalami penurunan pada inkubasi ke 48 jam. Pada pH 5 pertumbuhan bakteri mengalami kenaikan pada setiap waktu inkubasi, pH 8 pertumbuhan bakteri terjadi pada inkubasi 1 jam pertama, kemudian mengalami penurunan pertumbuhan pada inkubasi 24 jam, dan kembali naik pada waktu inkubasi 48 jam.

Pertumbuhan isolat KP3 pada pH 3 pada setiap waktu inkubasi mengalami kenaikan. Pada pH 5 pertumbuhan bakteri juga mengalami kenaikan disetiap jam, pH 8 pertumbuhan bakteri mengalami penurunan pertumbuhan dari jam 1 sampai 48 jam namun mengalami kenaikan pertumbuhan kembali pada inkubasi 48 jam.

Menurut Chou dan Weimer (1999) enzim dapat mempengaruhi pertumbuhan dari bakteri asam laktat pada pH rendah. Enzim-enzim yang mempengaruhi ketahanan bakteri asam laktat pada pH rendah adalah enzim protease. Selanjutnya dikatakan bahwa semakin tinggi enzim protease yang dimiliki oleh suatu isolat dapat meningkatkan ketahanannya pada kondisi asam. Salah satu enzim protease yaitu aminopeptidase dapat mempengaruhi adaptasi dan pertumbuhan dari isolat bakteri asam laktat pada kondisi asam (De Angelis *et al.*, 2001).

Enzim protease dibutuhkan oleh bakteri asam laktat untuk pertumbuhan dan menghasilkan asam dalam proses pembuatan produk fermentasi. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa bakteri calon probiotik juga dapat tumbuh tidak saja pada pH asam tetapi dapat tumbuh pada kisaran pH diatas 7 (netral).

Dilihat dari pertumbuhan isolat bakteri calon probiotik (KP1,KP2,KP3) selama 24 dan 48 jam dengan pH berbeda, isolat KP3 yang menunjukkan pertumbuhan yang terbaik dengan waktu

inkubasi 48 jam pada pH 5 karena pertumbuhan bakteri calon probiotik ini terus meningkat. Menurut Kanmani *et al.* (2010), salah satu karakteristik bakteri probiotik yaitu memiliki ketahanan yang tinggi terhadap asam. Bakteri probiotik mempunyai mekanisme kerja dapat menghasilkan asam, sehingga pH menjadi rendah.

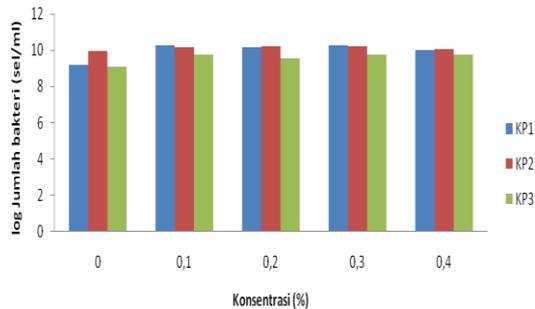
Keadaan ini tidak menguntungkan bagi mikroorganisme patogen. Casiano-Colon dan Marquis (1998), berpendapat bahwa BAL bertahan dari kerusakan asam karena adanya enzim histidin dekarboksilase dan enzim arginin deiminasi. Hasil ini menunjukkan bahwa hanya beberapa isolat bakteri asam laktat yang diuji dapat melewati saluran lambung yang bersifat asam. Toleransi bakteri asam laktat terhadap asam cukup tinggi disebabkan kemampuannya mempertahankan pH sitoplasma lebih basa daripada pH ekstraseluler (Hutkins dan Nannen, 1993).

Chou dan Weimer (1999) menyatakan bahwa enzim dapat mempengaruhi pertumbuhan dari bakteri asam laktat pada pH rendah. Enzim-enzim yang mempengaruhi ketahanan bakteri asam laktat pada pH rendah adalah enzim protease. Diungkapkan bahwa semakin tinggi enzim protease yang dimiliki oleh suatu isolat dapat meningkatkan ketahanannya pada kondisi asam. Salah satu enzim protease yaitu aminopeptidase dapat mempengaruhi adaptasi dan pertumbuhan dari isolat bakteri asam laktat pada kondisi asam (De Angelis *et al.*, 2001).

Enzim protease dibutuhkan oleh bakteri asam laktat untuk pertumbuhan dan menghasilkan asam dalam proses pembuatan produk fermentasi. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa bakteri calon probiotik juga dapat tumbuh tidak saja pada pH asam tetapi dapat tumbuh pada kisaran pH diatas 7 (netral).

Toleransi Isolat Bakteri Calon Probiotik terhadap Garam Empedu

Hasil pengujian toleransi isolat bakteri calon probiotik terdiri dari (KP1, KP2, dan KP3) terhadap garam empedu, yang ditumbuhkan dengan menambahkan konsentrasi garam empedu yang berbeda pada setiap media MRS agar dapat dilihat pada dan Gambar 2.



Gambar 2. Jumlah rata-rata bakteri calon probiotik pada konsentrasi garam empedu yang berbeda

Pada Gambar 2 terlihat bahwa rata-rata perhitungan koloni bakteri calon probiotik terhadap garam empedu pada setiap isolat bakteri calon probiotik, isolat KP1 dan KP2 dengan setiap konsentrasi garam empedu yang berbeda mengalami pertumbuhan bakteri tinggi akan tetapi pada konsentrasi garam empedu 0,4 mengalami penurunan, sedangkan pada isolat bakteri pada KP3 pertumbuhan bakteri rendah tetapi pada konsentrasi 0,4 garam empedu pertumbuhan bakteri tinggi.

Jadi dari hasil yang didapat bakteri yang cocok untuk dijadikan bakteri calon probiotik diambil berdasarkan jumlah rata-rata bakteri yang tinggi pertumbuhannya ialah pada isolat KP2 pada konsentrasi garam empedu 0,3 %, karena rata-rata pada isolat KP2 di konsentasi garam empedu 0,3 % pertumbuhan bakteri meningkat. Dari hasil tersebut dilihat bahwa adanya perbedaan jumlah bakteri dari ketiga isolat uji. Pada konsentrasi garam empedu 0 % tidak terlihat perbedaan jumlah antara isolat KP1, KP2

dan KP3. Dari uji ANOVA menunjukkan tidak adanya perbedaan nyata ($P > 0,05$).

Pada penelitian ini didapatkan bahwa ketiga isolat bakteri asam laktat yang diuji (KP1, KP2, dan KP3) dapat tumbuh pada konsentrasi garam empedu yang berbeda. Hasil ini tidak jauh berbeda dari penemu-penemu terdahulu, salah satunya Nursyirwani (2013), mendapatkan hasil bakteri asam laktat yang diisolasi dari ikan kerapu macan, dari pengamatan pertumbuhan isolat bakteri asam laktat pada medium agar MRS dengan konsentrasi *bile salt* 0,2, 0,3, 0,4 dan 0,5 % menunjukkan 19 isolat dari 20 isolat bakteri asam laktat dapat tumbuh pada semua konsentrasi *bile salt*, sedangkan satu isolat yaitu isolat KSBU 13D tidak dapat tumbuh pada semua konsentrasi *bile salt* yang diujikan.

Hasil pengujian ketahanan masing-masing isolat terhadap konsentrasi garam empedu 0, 0,1, 0,2, 0,3, dan 0,4 % dapat dilihat pada Tabel 2, menunjukkan bahwa rata-rata jumlah bakteri calon probiotik terhadap garam empedu pada setiap isolat bakteri calon probiotik, isolat KP1 dan KP2 dengan setiap konsentrasi garam empedu yang berbeda mengalami pertumbuhan bakteri tinggi akan tetapi pada konsentrasi garam empedu 0,4 mengalami penurunan, sedangkan pada isolat bakteri pada KP3 pertumbuhan bakteri rendah tetapi pada konsentrasi 0,4 % garam empedu pertumbuhan bakteri tinggi.

Hasil yang didapat bakteri yang cocok untuk dijadikan bakteri calon probiotik diambil berdasarkan jumlah rata-rata bakteri yang tinggi pertumbuhannya ialah pada isolat KP2 pada konsentrasi garam empedu 0,3 %, karena rata-rata pada isolat KP2 di konsentasi garam empedu 0,3 % pertumbuhan bakteri meningkat.

Hasil ini sesuai dengan penelitian-penelitian lain (Kusumawati, 2002; Kimoto

et al., 1999; Ngatirah *et al.*, 2000) yang juga menunjukkan bahwa bakteri asam laktat memiliki ketahanan terhadap garam empedu yang beragam. Chou dan Weimer (1999) juga mendapatkan bahwa diantara galur-galur bakteri asam laktat dari spesies yang sama serta diisolasi dari sumber yang sama, memiliki keragaman pada toleransinya terhadap garam empedu.

Toleransi yang baik terhadap garam empedu ini diduga karena peranan polisakarida sebagai salah satu komponen penyusun dinding sel bakteri Gram positif, tetapi mekanisme yang terlibat di dalamnya belum diketahui dengan jelas. Bakteri asam laktat yang tidak mampu bertahan dan tumbuh dengan baik dalam kondisi usus halus dapat disebabkan oleh perubahan permeabilitas seluler dan kebocoran materi intraseluler yang dialami lebih besar sehingga menyebabkan lisisnya sel dan menyebabkan kematian.

Menurut Hill (1995), memaparkan bakteri asam laktat sebagai isolat probiotik untuk dapat bertahan dan tumbuh pada saluran pencernaan harus mampu melewati berbagai kondisi lingkungan yang menekan, salah satunya adalah pada saat bakteri memasuki bagian atas saluran usus yang merupakan tempat empedu disekresikan ke dalam usus.

Gilliland *et al.* (1984), Mengatakan konsentrasi garam empedu sebesar 0,3% merupakan konsentrasi yang kritikal dan merupakan nilai yang cukup tinggi untuk melakukan seleksi isolat yang resisten terhadap garam empedu. Semakin tinggi konsentrasi garam empedu, maka jumlah sel *Lactobacillus* yang mati juga akan meningkat.

Hal ini disebabkan peningkatan aktivitas enzim β -galaktosidase terhadap garam empedu, sehingga meningkatkan permeabilitas membran sel. Bila permeabilitas sel meningkat maka banyak materi intraseluler yang keluar dari dalam sel. Bila hal ini berlangsung terus menerus

akan menyebabkan lisis bakteri. Enzim β -galaktosidase merupakan enzim intraseluler dari bakteri.

Kusumawati (2002) melaporkan bahwa isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari makanan fermentasi asal Indonesia menunjukkan perbedaan ketahanan untuk tumbuh pada lingkungan yang mengandung garam empedu 1% dan 5%, perbedaan tersebut bersifat beragam untuk masing-masing galur.

Ngatirah *et al.* (2000) menguji ketahanan isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari makanan fermentasi dan feses bayi terhadap garam empedu. Pengujian dilakukan pada MRSB yang mengandung garam empedu 10% selama 24 jam. Ketahanan terhadap garam empedu dihitung berdasarkan selisih unit OD (*Optical Density*) pada panjang gelombang 660 nm yang dicapai setelah inkubasi 24 jam dengan OD pada awal inkubasi yang hasilnya berkisar antara 1,16-2,34.

Penelitian tersebut mampu mengungkap bahwa isolat yang diisolasi dari sumber yang sama memiliki ketahanan terhadap garam empedu yang beragam atau ketahanan terhadap garam empedu bersifat *strain dependent*. Wirawati (2002) menyatakan ketahanan isolat bakteri asam laktat asal tempoyak terhadap garam empedu 0,3% berkisar antara 34,8%-100%.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa tiga isolat BAL (KP1, KP2, KP3) menunjukkan toleran (dapat hidup) pada pH 3, 5 dan 8. Toleransi tertinggi ditunjukkan oleh isolat KP3 dengan waktu inkubasi 48 jam pada pH 5. Ketiga isolat bakteri asam laktat tersebut juga dapat hidup pada garam empedu 0, 0,1, 0,2, 0,3 dan 0,4 %. Toleransi yang tertinggi ditunjukkan oleh isolat KP2 pada

konsentrasi 0,3 % garam empedu. Penelitian selanjutnya disarankan sebelum isolat calon probiotik diaplikasikan pada budidaya ikan, perlu dilakukan uji patogenitas untuk mengetahui apakah isolat calon probiotik tersebut bersifat patogen atau tidak pada ikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto E dan Lifiawaty. 2005. *Pakan Ikan*. Kanisius, Yogyakarta
- Afrimansyah. 2015. Isolasi Bakteri Calon Probiotik dari Ikan Kakap Putih (*Lates carcarifer*) yang bersifat antagonis terhadap *Vibrio alginoliticus*. Jurusan Ilmu Kelautan. Universitas Riau, Pekanbaru.
- Begley, M., C. G. M. Gahan, and C. Hill. 2002. Bile Stress Response In *Listeria monocytogenes* LO28: Adaptation, Cross-Protection, And Identification Of Genetic Loci Involved In Bile Resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:6005-6012 dalam <http://aem.asm.org/cgi/content/full/68/12/6005>. Diakses tanggal 20 Januari 2007 10.11 WIB.
- Berrada, N., Lemeland J.F., Laroch G, Thouvenot P., and Piala M. 1991. Bifidobacterium from fermented milks: Survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* 74: 409-413.
- Bezkorovainy, A. 2001. Probiotics: Determinants Of Survival And Growth In The Gut. *Am.J. Clin. Nutr.* 73, 399S-405S dalam <http://www.ajcn.org/cgi/content/full/73/2/399S>. Diakses tanggal 09 November 2006 jam 15.40 WIB.
- Casiano-Colon A, and R.E. Marquis. 1998. Role of The Arginine Deiminase System In Protecting Oral Bacteria and An Enzymatic Basis for Acid Tolerance. *Appl Environ Microbiol.* 54(6):1318-1324.
- Chou LS, Weimer B. 1999. Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal Dairy Science.* 62:23-31
- De Angelis, M., A. Corsetti, N. Tosti, J. Rossi, M. R. Corbo, and M. Gobbetti. 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2011–2020.
- Gilliland, S. E., T. E. Stanley, and L. J. Bush. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* 67:3045–3051.
- Hill, M. J. 1995. Role of Gut Bacteria in Human Toxicology and Pharmacology. Taylor and Franchis Group, New York.
- Hutkins, R.W. and Nannen N.L. 1993. pH homeostatis in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 76 : 2354-2365.
- Kanmni, P., Kumar, R. S., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukemar, V., dan Arul, V. 2010. Comparison of Antimicrobial Activity of Probiotic Bacterium *Streptococcus phocae* P180, *Enterococcus faecium* MC13 and *Carnobacterium divergens* Against Fish Patogen. *World journal of Dairy and Food Sciences.* 7(2):145-151.
- Kimoto, H., J. Kurisaki, N.M. Tsuji, S. Ohmomo and T. Okamoto. 1999. Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low

- pH and bile. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:313-316.
- Kusumawati, N. 2002. Seleksi bakteri asam laktat indigenus sebagai galur probiotik dengan kemampuan mempertahankan keseimbangan mikroflora usus feses dan mereduksi kolesterol serum darah tikus. Tesis. Institut Pertanian Bogor : Program Studi Ilmu Pangan.
- Nannen NL and R.W, Hutkins.1992. *Intracellular pH effect in lactic acid bacteria.* *J Dairy sci* 74-741-746
- Nayak, SK. 2010. Probiotic and imunity. Review. *Fish and shelfish immunology.* 29:2 -14
- Ngatirah, E Harmayani, E.S Rahayu, T.U Tami. 2000. *Seleksi Bakteri Asam Laktat Sebagai Agensia Probiotik yang Berpotensi Menurunkan Kolesterol.* Seminar Nasional Industri Pangan. Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia. Surabaya.
- Nursyirwani. 2013. Seleksi karakterisasi bakteri asam laktat (BAL) untuk penanggulangan penyakit vibriosis pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). Disertasi. Fakultas kedokteran hewan Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta : Program pasca sarjana.
- Saunders D.R., C.E. Rubin, dan J.D. Ostrow, 2005. Small Bowel; The Gut Course (HUBIO551) On LineSyllabus dalam http://www.uwgi.org/gut/smallbowel_09.asp. Diakses tanggal 03 Juni 2006 jam 10:21 WIB.
- Watson, A.K., H. Kaspar, M.J. Lategan and L. Gibson. 2008. Probiotic in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274: 1-14.
- Wirawati, C. U. 2002. Potensi bakteri asam laktat yang diisolasi dari tempoyak sebagai probiotik. Tesis. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.