

## PROSPEKTIF KOMBINASI SUSU PROBIOTIK *Lactobacillus acidophilus* DAN *Bifidobacterium bifidum* SEBAGAI SEDIAAN ANTI DIARE

<sup>2</sup>ROHDIYA WAHYUNI, <sup>1</sup>ISNAENI\*, <sup>1</sup>ASRI DARMAWATI

<sup>1</sup>Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

<sup>2</sup>Mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya 60286 Indonesia

\*E-mail: isnaeni\_yudi@yahoo.com

### ABSTRACT

*In the course of our screening program for anti diarrheal bacterial – Escheria coli, Salmonella typhimurium, and Vibrio cholerae agents from fermented probiotic milk, Lactobacillus acidophilus FNCC-0051 and Bifidobacterium bifidum as a potential probiotic were picked out for further investigation. Each probiotic microorganism was prepared as fermented milk by using 15% skim milk. Inhibition potency of the fermented milk that consisted of both probiotic microorganisms at 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, and 9:1 ratio was assayed against diarrheal causing bacteria. The combination of two fermented probiotic milk showed strong inhibition against test bacteria at ratio of 4:6 and the MIC is 30%. On the other hands, total plate count of the combination is 10<sup>8</sup>cfu/mL, is comply with the requirement for intestine as target side of action. Thus, the combination was considered of great potential to develop as an anti diarrheal preparation.*

**Keywords :** *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, anti-diarrhea, probiotik, fermented milk

### PENDAHULUAN

Probiotik didefinisikan sebagai mikroba hidup yang memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan dan kehidupan inangnya (Tamime *et al.*, 2005). Beberapa probiotik yang merupakan flora normal telah berhasil diisolasi, antara lain bakteri asam laktat (BAL). Sediaan obat atau makanan yang mengandung probiotik telah beredar di pasaran dan dimanfaatkan oleh masyarakat untuk berbagai tujuan, misalnya anti diare dan untuk meningkatkan sistem imunitas tubuh. Jenis probiotik yang paling banyak digunakan adalah golongan *Lactobacillus* sp. dan *Bifidobacterium* sp. Probiotik yang digunakan baik sebagai obat maupun *food supplement* dapat berada dalam bentuk biomassa bakteri yang dijebak dalam matrik tertentu atau dalam bentuk sediaan susu fermentasi yang dikenal sebagai yogurt.

Penelitian ini akan melaporkan hasil kajian aktivitas antibakteri sediaan susu probiotik *B. bifidum* dan *L. acidophilus* FNCC-0051 terhadap bakteri penyebab diare *E. coli*, *S. typhimurium*, dan *V. cholera*. Menurut Lourens-Hattingh dan Valjoen (2001), *Lactobacillus* sp. dan *Bifidobacterium* sp. menghasilkan beberapa metabolit antara lain asam laktat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin yang mampu menghambat pertumbuhan dan/atau membunuh bakteri patogen. Mekanisme lain yang

menyebabkan probiotik mampu melawan mikroba patogen adalah antagonis kompetitif melalui kompetisi adesi pada sel epitel, kompetisi penggunaan nutrisi dan meningkatkan sistem imun tubuh inang.

Laporan Riskesdas tahun 2007 menunjukkan bahwa penyakit diare merupakan penyebab kematian nomor satu pada bayi (31,4%) dan pada balita (25,2%), sedangkan pada golongan semua umur merupakan penyebab kematian yang keempat (13,2%). Kajian aktivitas anti bakteri penyebab diare pada penelitian ini difokuskan pada optimasi perbandingan susu probiotik *B. bifidum* dan *L. acidophilus* yang diharapkan menghasilkan efek potensiasi dengan jumlah sel mikroba yang memenuhi persyaratan sesuai kebutuhan sel target sebagai anti diare.

### METODE PENELITIAN

#### Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, inkubator (Memmert), jangka sorong, pipet mikro (Socorex), vortex (Type 161700 mixer), otoklaf (HL-340 series vertical type steam sterilizer), spektrofotometer UV-Vis (Thermo Fisher Scientific 5225 Verona Road), viskosimeter VT-04, viskosimeter VT-03, colony counter, dan pH meter SCHOTT glass mainz tipe CG 842.

## Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur bakteri probiotik *L. acidophilus* FNCC-0051 yang diperoleh dari Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, dan *B.bifidum* yang diperoleh dari Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya. Isolat Bakteri uji *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, dan *Salmonella thyphimurium* diperoleh dari *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya. Media MRS (*deMan Rogosa Sharpe*) agar Oxoid (CM0361), media MRS broth Oxoid (CM0359), media Nutrient agar Oxoid (CM0003), NaCl p.a, Air suling, Susu skim rasa plain. Ciprofloxacin infus iv 0,2% (Dexamedica) tiap mL infus mengandung Ciprofloxacin laktat H<sub>2</sub>O 2,66 mg setara dengan Ciprofloxacin base 2,0 mg.

## Metode uji daya anti bakteri

### 1. Peremajaan Kultur Bakteri

Bakteri probiotik dari kultur persediaan induk diperbanyak dengan cara diambil sebanyak satu Öse, dinokulasi dalam media agar miring MRS, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri uji dari kultur persediaan induk diperbanyak dengan cara yang sama, dinokulasi dalam media agar miring Nutrien, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

### 2. Penyiapan Starter Probiotik

Bakteri probiotik yang telah diinkubasi selama 24 jam diambil 1 Öse, diinokulasikan dalam 10 mL larutan MRS broth steril, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi bakteri diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm sehingga diperoleh transmittan 25%, digunakan blanko MRS broth.

### 3. Pembuatan Yoghurt

Preparasi bahan baku susu fermentasi menggunakan bubuk susu skim 15,0 gram dilarutkan dalam 100 mL air suling, kemudian dipanaskan pada suhu 80-85°C selama 15 menit. Selanjutnya didinginkan sampai suhu 42-45 °C, ditambah 10% starter probiotik, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 8 jam. Setelah yoghurt terbentuk. Standar mutu yoghurt disesuaikan SNI, meliputi: Organoleptis,

pemeriksaan pH, viskositas, densitas, dan Angka Lempeng Total (ALT).

Untuk penentuan ALT: ditimbang 1 gram yoghurt dicampur dengan 9 mL larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) steril pH 7,4 dalam tabung reaksi, divortex sampai homogen, diberi label 10<sup>-1</sup>, ambil 1 mL larutan dari tabung 10<sup>-1</sup> ke dalam tabung reaksi baru yang berisi 9 mL larutan PBS, divortex dan beri label 10<sup>-2</sup> dan seterusnya sampai tabung ke-10<sup>-10</sup>. Disiapkan 1 tabung reaksi yang berisi 9 mL PBS sebagai blanko. Diambil 1 mL dari setiap tabung pengenceran di atas, kemudian dimasukkan dalam media MRS agar suhu 45-55°C, divortex dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang telah diberi label berdasarkan nomor pengenceran, dihomogenkan, didiamkan hingga memadat, diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Jumlah bakteri pada lempeng agar dihitung menggunakan *colony counter*. Petri yang mengandung koloni 30-300 bakteri dijadikan landasan untuk perhitungan ALT.

### 4. Penyiapan Inokulum Bakteri Uji

Ke dalam biakan segar bakteri uji yang berumur 24 jam dimasukkan 10 mL larutan NaCl 0,9% steril, kemudian divortex, selanjutnya diukur kerapatan optiknmya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm, dilakukan pengaturan konsentrasi inokulum sehingga diperoleh transmittan 25%, menggunakan larutan NaCl 0,9% sebagai blanko (Depkes RI, 1995).

### 5. Penyiapan Media Uji

Disiapkan 2 buah tabung reaksi berisi media *Nutrient agar* masing-masing sebanyak 15,0 mL (sebagai *seed layer*) dan 35,0 mL (sebagai *based layer*). Media *based layer* diletakkan pada cawan petri steril, diratakan dan didiamkan hingga memadat. Selanjutnya diambil 5µL inokulum bakteri uji yang mempunyai transmittan 25%, dimasukkan ke dalam 15,0 mL media *seed layer*, divortex hingga homogen, dituangkan pada permukaan media *based layer* yang telah memadat, diratakan, didiamkan hingga memadat. Dibuat lubang dengan alat pelubang agar sebagai pencadangan larutan standar dan larutan uji.

## 6. Uji Potensi Probiotik Tunggal

Larutan uji yoghurt *L. Acidophilus* dan *B. Bifidum* diblender terlebih dahulu sebelum dipipet masing-masing sebanyak 60 µL, kemudian dimasukkan ke dalam pencadang (diameter 0,7 cm dan tinggi 1 cm) pada media uji. Selanjutnya petri dimasukkan inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Di akhir masa inkubasi, zona jernih yang terbentuk di sekitar pencadang diamati dan diukur diameternya (mm).

## 7. Uji Potensi Kombinasi Probiotik

Larutan uji atau campuran yoghurt *L. Acidophilus* dan *B. Bifidum* pada berbagai perbandingan: 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 dan 9:1 dipipet sebanyak 60 µL kemudian dimasukkan ke dalam pencadang (diameter 0,7 cm dan tinggi 1 cm) pada media uji. Selanjutnya petri dimasukkan inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Di akhir masa inkubasi, zona jernih yang terbentuk di sekitar pencadang diamati dan diukur diameternya (mm).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi susu probiotik *L. acidophilus* dan *B. bifidum* tersaji pada Tabel 1. Dibandingkan standar (SNI, 2009) dan data dalam pustaka susu probiotik yang dihasilkan memenuhi persyaratan. Sesuai dengan tujuan penelitian, kombinasi susu probiotik memberikan nilai ALT sesuai dengan persyaratan jumlah koloni bakteri probiotik dalam

## 8. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kombinasi Yoghurt

Dari hasil penapisan (tahap 7) diperoleh perbandingan kombinasi yoghurt yang menunjukkan potensi terbesar terhadap masing-masing bakteri uji, dilakukan penetapan KHM dengan mengukur daya hambat larutan uji pada rentang konsentrasi 10-100% menggunakan *serial dilution*, masing-masing ditanam pada media uji. Diameter zona yang dihasilkan diamati, respon yang dihasilkan larutan uji pada semua konsentrasi dibandingkan untuk menetapkan KHM.

### Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah perbandingan konsentrasi yoghurt *B. bifidum* dan *L. acidophilus*. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan pada uji daya hambat. Variabel terkontrol penelitian ini adalah volume larutan uji (susu probiotik) yang dimasukkan dalam pencadang, jumlah inokulum bakteri uji, jenis media yang digunakan, waktu dan suhu inkubasi.

target sel di intestin, yaitu minimal  $10^6$  cfu/mL. Perubahan spesifikasi susu skim menjadi susu probiotik, terutama terkait pH dan viskositas mengindikasikan terjadinya proses fermentasi oleh probiotik. Nilai pH yang rendah (asam), dapat disebabkan oleh kemampuan probiotik menghasilkan asam laktat dan asam-asam organik lain.

**Tabel 1.** Hasil Karakterisasi Susu Skim dan susu probiotik

	Parameter uji	Hasil pengamatan	Spesifikasi menurut SNI (2009)
Susu Skim	Bau	Susu	Normal
	Warna	Putih	Tidak tercantum
	Bentuk	Cair	Tidak tercantum
	Rasa	Plain (susu tawar)	Normal
	pH	6,50 ± 0,00*	Tidak tercantum
	Viskositas (dPas)	0,26 ± 0,03*	Tidak tercantum
	Berat Jenis (g/mL)	1,04 ± 0,00*	Tidak tercantum
	Susu Probiotik	Parameter uji	Hasil pengamatan

<i>L. acidophilus</i>	(2009)		
Bau	Asam	Normal/ khas	
Warna	Putih	Tidak tercantum	
Bentuk	Cairan kental	Cairan kental-padat	
Rasa	Asam	Normal / khas	
pH	4,62 ± 0,01*	<5 (Gomes & Malcata, 1999)	
Viskositas (dPas)	6,50 ± 0,50*	Tidak tercantum	
Berat Jenis (g/mL)	1,07±0,00*	Tidak tercantum	
<b>Susu Probiotik <i>B.bifidum</i></b>	<b>Parameter uji</b>	<b>Hasil pengamatan</b>	<b>Spesifikasi menurut SNI (2009)</b>
	Bau	Asam	Normal/ khas
	Warna	Putih	Tidak tercantum
	Bentuk	Cairan kental	Cairan kental-padat
	Rasa	Asam	Normal / khas
	pH	4,34 ± 0,08*	4,2-4,7 (Gomes & Malcata, 1999)
	Viskositas (dPas)	3,00 ± 0,00*	Tidak tercantum
	Berat Jenis (g/mL)	1,05 ± 0,00*	Tidak tercantum

\* : replikasi tiga kali ± SD

Hasil uji aktivitas daya hambat larutan uji terhadap pertumbuhan bakteri uji yang dinyatakan sebagai diameter zona hambat (mm) Tersaji pada Tabel 2 dan Gambar 1. Dari kedua data tersebut dapat diinformasikan bahwa susu probiotik *L. acidophilus* menunjukkan aktivitas daya hambat

terhadap ketiga bakteri uji relatif lebih rendah dibandingkan susu probiotik *B. Bifidum*. Diameter zona hambat terbesar dihasilkan oleh kombinasi susu probiotik pada rasio volume 4:6, relatif lebih tinggi dibandingkan aktivitas susu probiotik dalam *L.acidophilus* atau *B.bifidum*.



**Gambar 1.** Hasil Uji Aktivitas

**Tabel 2.** Hasil pengamatan diameter zona hambat kombinasi Yoghurt terhadap Bakteri Penyebab Diare

Kombinasi perbandingan ( <i>L.acidophilus</i> : <i>B.bifidum</i> )	Diameter Zona Hambat (mm) ± SD		
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>V. cholerae</i>
La	9,63 ± 0,25	8,67 ± 0,45	9,90 ± 0,53
Bb	10,63 ± 0,30	9,47 ± 0,55	11,90 ± 0,30
1:9	10,40 ± 0,36	9,76 ± 0,15	11,25 ± 0,15
2:8	11,05 ± 0,15	10,63 ± 0,30	11,67 ± 0,25
3:7	11,95 ± 0,15	11,07 ± 0,38	12,47 ± 0,21
<b>4:6</b>	<b>12,40 ± 0,40</b>	<b>11,23 ± 0,30</b>	<b>13,07 ± 0,35</b>
5:5	10,43 ± 0,42	11,00 ± 0,10	12,37 ± 0,15
6:4	10,60 ± 0,20	10,27 ± 0,15	11,27 ± 0,76
7:3	10,27 ± 0,25	9,73 ± 0,30	10,83 ± 0,40
8:2	9,93 ± 0,38	9,43 ± 0,50	10,33 ± 0,25
9:1	9,60 ± 0,36	9,13 ± 0,35	9,37 ± 0,15
Kontrol +	22,63 ± 0,30	21,55 ± 0,05	22,50 ± 0,40
Kontrol -	7,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00

Keterangan Tabel 2 : Diameter zona hambat terbesar

Kontrol + : antibiotik ciprofloksasin 10 ppm

Kontrol - : susu skim

La : yoghurt *Lactobacillus acidophilus*

Bb : yoghurt *Bifidobacterium bifidum*

Diameter Pencanang : 7 mm

**Tabel 3.** Diameter zona hambat KHM Kombinasi Yoghurt Terhadap Bakteri Uji

Konsentrasi <i>L.acidophilus</i> : <i>B.bifidum</i> (4:6)	Diameter Zona Hambat (mm) ± SD		
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>V. cholerae</i>
Cipro 2 ppm	16,57 ± 0,32	16,27 ± 0,38	16,53 ± 0,15
100%	13,60 ± 0,20	12,40 ± 0,30	13,47 ± 0,35
80%	11,57 ± 0,30	10,67 ± 0,40	12,30 ± 0,35
60%	10,53 ± 0,35	9,67 ± 0,25	11,17 ± 0,21
40%	9,53 ± 0,12	8,57 ± 0,21	9,37 ± 0,25
35%	9,13 ± 0,58	8,17 ± 0,12	9,50 ± 0,10
30%	8,70 ± 0,20	7,00 ± 0,00	8,77 ± 0,31
25%	7,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00
20%	7,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00
10%	7,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00
Kontrol -	7,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00

Keterangan Tabel 3 : KHM

Diameter Pencanang : 7 mm

Kombinasi susu probiotik dengan rasio volume 4:6 dapat diusulkan dan prospektif untuk dikembangkan sebagai sediaan susu probiotik untuk anti diare. Fenomena ini diusulkan didukung data ALT kombinasi susu probiotik  $10^8$  cfu/mL yang

memenuhi persyaratan sediaan dengan target kerja di intestin. Syarat probiotik untuk bisa menimbulkan efek menyehatkan bagi intestinal dan menghambat bakteri patogen adalah minimal  $10^6$  cfu/mL (Kailasapath dan Chin, 2000). Diameter

zona hambat terbesar dari kombinasi *L.acidophilus* dan *B.bifidum* terhadap bakteri uji yaitu *E.coli*, *S. typhimurium* dan *V. Cholerae* berturut turut adalah  $12,40 \pm 0,40$  mm,  $11,23 \pm 0,30$ mm, dan  $13,07 \pm 0,35$ mm. Pada perbandingan kombinasi tersebut diperoleh konsentrasi hambat minimum terhadap bakteri uji yaitu *E.coli*, *S. typhimurium* dan *V. Cholerae* berturut turut adalah 30%, 35%, dan 30%.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah menyediakan sarana dan prasarana sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik. Terima kasih kami sampaikan kepada Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya dan *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya yang telah menyediakan bakteri probiotik dan bakteri penyebab diare dalam penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed FE. 2003. Genetically modified probiotics in foods. *Trends Biotechnol.*, Vol 21, hal. 491–497.
- Anal, A. K. and Singh, H., 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Sci. Technol.* vol. 18, p.240-251.
- Brooks G F , Carrol K C, Butel J S, Morse S A, Mietzner T A. 2010. *Jawetz, Melnick, Adelberg Mikrobiologi Kedokteran.*: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Departemen Kesehatan RI. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi V. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan RI. 2013. *Profil Kesehatan Indonesia 2012*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Hal 90.
- Farthing M, Lindberg G, Dite P, Khalif I, Salazar-Lindo, Goh K, Thomson A, Khan A G. 2008. *World Gastroenterology Organisation practice guideline: Acute diarrhea*. World Gastroenterology Organisation.
- Farthing M, Salam M, Lindberg G, Dite P, Khalif I, Salazar-Lindo, Ramakrishna B S, Goh K, Thomson A, Khan A G, Krabshuis J, LeMair A. 2012. *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Probiotics and prebiotics*. World Gastroenterology Organisation.
- Food and Agriculture Organization. 2006. *Probiotics in food health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. FAO Food and Nutrition Paper. Roma: World Health Organization and Food and Agriculture Organization of The United Nations.
- Goderska, Kamila dan Czarnecki, Zbigniew. 2007. Characterization of selected strains from *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. *African Journal of Microbiology Research*. Vol 1 (6) p.065-078.
- Gomes A M P, dan Malcata F X. 1999. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology* 10 (1999) 139-157.
- Holzappel W H, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* vol. 73, p.365S–373S.
- Jones A C and Farthing, M J G. 2004. Management of Infectious Diarrhoea. *Gut* 2004;53:296–305. doi: 10.1136/gut.2003.022103.
- Kailasapath K. dan Chin J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium sp.* *Immunology and Cell Biology* 78, 80–88.
- Kuntarso A. 2007. *Pengembangan Teknologi Pembuatan Low-Fat Fruit Bio-Yoghurt (Lo-Bio F)*. Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Lannitti T and Palmieri B. 2010. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clin. Nutr.* vol. 29, p.701-725.
- Lourens-Hattingh A, Viljoen B C. 2001. Yoghurt as probiotic carrier food. *International Dairy J* 11: 1-17.
- Marteau P. 2001. Prebiotics and probiotics for gastrointestinal health. *Am J Clin Nutr* 2001; 20 (Suppl): 41-45.