

## EVALUASI IN VITRO TERHADAP KEMAMPUAN ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT ASAL AIR SUSU IBU UNTUK MENGASIMILASI KOLESTEROL DAN MENDEKONJUGASI GARAM EMPEDU

[In Vitro Evaluation of Cholesterol Assimilation and Bile Salt Deconjugation by Lactic Acid Bacteria Isolated from Breast Milk]

Lilis Nuraida<sup>1,2)\*</sup>, Siti Winarti<sup>2)</sup>, Hana<sup>1,3)</sup>, dan Endang Prangdimurti<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> South East Asian Food and Agriculture Science and Technology Center IPB

<sup>2)</sup> Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian IPB

<sup>3)</sup> Program Studi Ilmu Pangan Pasca Sarjana IPB

Diterima 05 Mei 2011 / Disetujui 12 Agustus 2011

### ABSTRACT

Hypercholesterolemia is a risk factor for cardiovascular disease, the leading cause of death in many countries. Several studies have shown that reduction of excessive levels of cholesterol in the blood decreases the risk of cardiovascular disease. It is therefore important to develop ways of reducing serum cholesterol. Based on *in vitro* and *in vivo* studies, some of lactic acid bacteria (LAB) having potential probiotic properties can reduce total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels. The aim of this study was to evaluate the ability of LAB isolated from breast milk in reducing cholesterol by assimilation and by bile salt deconjugation activity *in vitro*. Thirteen strains of LABs were evaluated for their acid and bile salt resistance and selected to test their ability to assimilate cholesterol and to deconjugate bile salt (sodium taurocholate) *in vitro*. Cholesterol assimilation activity was determined by measuring the difference between the remaining cholesterol in broth medium inoculated with LAB with cholesterol in control after incubation. Bile salt deconjugation activity was determined by measuring free cholic acid released in broth medium after incubation with LAB. The results show that most of the isolates were susceptible to low pH and all isolates used were able to survive in the presence of 0.5% bile salt. The LAB were also able to assimilate cholesterol at varying levels ranging from 0.86-14.97 µg/ml, with the highest activity showed by *Pediococcus pentosaceus* 1-A38, *Pediococcus pentosaceus* 2-B2 and *Pediococcus pentosaceus* 2-A16. Taurocholate deconjugation assay showed that the isolates have weak bile salts deconjugation activity as indicated by free cholic acid released ranging from 0.06-0.25 µmol/ml, with the highest release in *Pediococcus pentosaceus* 1-A38 and *Pediococcus pentosaceus* 1-A22. The present study suggest that *Pediococcus pentosaceus* 1-A38 was potential for the development of probiotic products with specific benefit to reduce cholesterol through cholesterol assimilation and deconjugation of bile salt.

**Keywords:** breast milk isolate, probiotics, lactic acid bacteria, cholesterol assimilation, bile salt deconjugation

### PENDAHULUAN

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa beberapa bakteri asam laktat (BAL) dapat menurunkan kolesterol secara *in vitro* maupun *in vivo* (Usman dan Hosono, 1999; Ngatirah *et al.*, 2000; Kusumawati, 2002; Liong dan Shah 2005; Lye *et al.*, 2010). Pada subjek yang hiperlipidemik umumnya efek yang diberikan dari konsumsi probiotik adalah penurunan kadar kolesterol, sedangkan pada subjek yang normal, efek yang umumnya terjadi adalah penurunan kadar trigliserida (Pereira dan Gibson, 2002).

Pengaruh laktobasili terhadap penurunan kolesterol diduga karena kemampuannya dalam mengasimilasi kolesterol dalam usus halus dan mendekongugasi garam empedu. Asam lemak rantai pendek yang diproduksi oleh laktobasili dapat menghambat sintesis kolesterol hepatic dan distribusi kolesterol di dalam plasma dan hati (Collado, 2009). Dekongugasi asam empedu telah dinyatakan sebagai salah satu aktivitas utama mikroba usus yang dapat dipertimbangkan sebagai probiotik (FAO/WHO, 2002). Asam empedu disintesis di dalam hati dari

kolesterol dan disekresikan sebagai konjugat dari glisin maupun taurin ke dalam usus dua belas jari dan akan berperan dalam memfasilitasi penyerapan lemak dan mengikuti sirkulasi enterohepatik (Hofmann, 1984). Selama sirkulasi dalam saluran pencernaan, garam empedu dapat mengalami modifikasi oleh mikrobiota usus, yaitu dekonjugasi garam empedu oleh enzim hidrolisis garam empedu (*bile salt hydrolase*-BSH) dengan melepaskan residu asam amino dan terbentuk asam empedu terdekongugasi (terutama jenis kolat dan quenodeoksikolat).

Nuraida *et al.* (2007) telah mengisolasi beberapa BAL dari air susu ibu (ASI). Beberapa diantaranya menunjukkan ketahanan yang baik terhadap asam dan atau garam empedu. Ketahanan terhadap asam dan garam empedu merupakan prasyarat suatu mikroorganisme dapat digunakan sebagai probiotik karena mengindikasikan kemampuannya bertahan hidup dalam saluran pencernaan. Isolat lokal asal ASI potensial untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai agen probiotik yang memberikan manfaat kesehatan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji kemampuan isolat BAL untuk mengasimilasi kolesterol dan mendekongugasi garam empedu berupa natrium taurokolat asal ASI, melalui penelitian ini diuji pula ketahanan isolat-isolat tersebut terhadap asam dan garam empedu.

\*Korespondensi Penulis :  
Email : lilis@seafast.org

## METODOLOGI

### Bahan dan alat

Bakteri asam laktat asal ASI berasal dari koleksi SEAFast Center, IPB. Bakteri asam laktat isolat ASI yang digunakan berjumlah 13 isolat, yang terdiri dari 11 isolat *Pediococcus* (*Pediococcus pentosaceus* 1-A8, *Pediococcus pentosaceus* 2-A16, *Pediococcus pentosaceus* 1-A20, *Pediococcus pentosaceus* 1-A22, *Pediococcus pentosaceus* 1-A23, *Pediococcus pentosaceus* 1-A38, *Pediococcus pentosaceus* 2-B2, *Pediococcus pentosaceus* 2-B11, *Pediococcus pentosaceus* 2-B13, *Pediococcus* R1, *Pediococcus* R9), 1 isolat *Leuconostoc* (R3), dan 1 isolat *Lactobacillus* (A6).

Isolat-isolat tersebut di atas terdiri atas isolat homofermentatif (*Pediococcus* dan *Lactobacillus*) dan isolat heterofermentatif (*Leuconostoc*). Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini yaitu medium cair dan medium agar de Mann Rogosa Sharpe (MRSB dan MRSA) (Oxoid), akuades, natrium tioglikolat (Sigma), kolesterol murni 95% (Sigma), oxgall (Merck), etanol (Merck), 2-propanol (Merck), KOH (Merck), n-heksana (Merck), gas nitrogen, asam asetat glasial (Merck), o-ftalaldehida (Sigma), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat (Merck), NaCl (Merck), HCl 37% (Merck). Alat-alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas laboratorium, timbangan, vorteks, refrigerator, spektrofotometer Shimadzu 2450, sentrifus berpendingin, inkubator, penangas air, otoklaf, serta perlengkapan laboratorium lainnya.

### Uji ketahanan terhadap pH rendah (Ngatirah *et al.*, 2000)

Sebanyak 1% (10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> cfu/ml) kultur yang telah disegarkan dalam MRSB selama 24 jam masing-masing diinokulasikan ke dalam MRSB yang terlebih dahulu diatur pH-nya sampai pH 2 menggunakan HCl 37%, kemudian diinkubasi selama 5 jam pada suhu 37°C. Hal ini disesuaikan dengan lamanya makanan berada di dalam lambung, yaitu 2-6 jam (Gropper *et al.*, 2009). Pada awal dan akhir inkubasi (0 dan 5 jam) dilakukan perhitungan jumlah total BAL dengan menggunakan metode hitungan cawan pada media MRSA. Semakin banyak penurunan jumlah sel setelah inkubasi maka semakin tidak tahan bakteri tersebut terhadap pH rendah.

### Uji ketahanan terhadap garam empedu (Modifikasi Ngatirah *et al.*, 2000)

Pengujian ini dilakukan sesuai dengan prosedur yang dilakukan Ngatirah *et al.* (2000), namun jumlah bakteri dihitung menggunakan metode hitungan cawan. Sebanyak 1% (10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> cfu/ml) kultur yang telah disegarkan dalam MRSB selama 24 jam ditumbuhkan dalam media MRSB yang mengandung 0,5% oxgall, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada awal dan akhir inkubasi (0 dan 24 jam) dilakukan perhitungan jumlah total BAL dengan menggunakan metode hitungan cawan pada media MRSA. Semakin banyak penurunan jumlah sel setelah inkubasi maka semakin tidak tahan bakteri tersebut terhadap garam empedu.

### Uji asimilasi kolesterol secara *In Vitro* (Modifikasi Kimoto *et al.*, 2002)

Uji asimilasi kolesterol pada penelitian ini menggunakan metode Kimoto *et al.* (2002) dengan modifikasi pada jumlah dan pelarut kolesterol yang digunakan. Dalam penelitian ini digunakan 2-propanol untuk melarutkan kolesterol. MRSB yang mengandung 0,2% natrium tioglikolat (b/v) dan 0,3% oxgall (b/v) ditambah dengan larutan kolesterol steril (2,5 mg/ml dalam 2-propanol) sehingga konsentrasi akhir kolesterol dalam broth 95 µg/ml. Sebanyak 10 ml campuran tersebut diinokulasi dengan 100 µl kultur BAL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 jam. Setelah diinkubasi, sel dipisahkan dari larutan dengan sentrifugasi selama 10 menit pada 12000 x g dan suhu 4°C. Kemudian dianalisis jumlah kolesterol yang diasimilasi berdasarkan metode modifikasi Gilliland *et al.* (1985).

Konsentrasi kolesterol terasimilasi ditentukan berdasarkan selisih konsentrasi kolesterol yang terdapat pada media kontrol (media yang tidak diinokulasi kultur) dengan media uji (diinokulasi dengan kultur). Konsentrasi kolesterol pada masing-masing media diukur dengan menggunakan reagen o-ftalaldehida (0,5 mg o-ftalaldehida dalam 1 ml asam asetat glasial) berdasarkan metode Gilliland *et al.* (1985) dengan modifikasi jumlah supernatan yang dianalisis menjadi dua kali lipat. Metode ini merupakan analisis konsentrasi kolesterol secara kimiawi. Prinsip metode o-ftalaldehida adalah terjadinya reaksi antara kolesterol dengan o-ftalaldehida dan asam sulfat pekat membentuk senyawa kompleks yang berwarna. Warna yang terbentuk diukur pada panjang gelombang 550 nm. Intensitas warna berbanding lurus dengan konsentrasi kolesterol.

Sebanyak 1 ml supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi (dibuat duplo untuk masing-masing sampel). Selanjutnya ke dalam tabung tersebut ditambahkan 3 ml etanol 95%, divortex, ditambah 2 ml KOH 50%, lalu divortex kembali. Tabung tersebut dipanaskan di atas penangas air bersuhu 60°C selama 10 menit, lalu dibiarkan sampai suhu kamar dan setelah itu ditambah dengan 5 ml n-heksana. Setelah penambahan heksana, tabung berisi larutan divortex, selanjutnya ditambah 3 ml akuades dan divortex kembali. Larutan dibiarkan selama 15 menit pada suhu kamar agar terjadi pemisahan.

Sebanyak 2,5 ml lapisan heksana yang terpisah dipindahkan ke dalam tabung reaksi lain, kemudian dievaporasi pada suhu 60°C di bawah aliran gas nitrogen. Setelah evaporasi, ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 4 ml reagen o-ftalaldehida. Tabung dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar, kemudian ditambahkan 2 ml asam sulfat pekat (dipipet secara perlahan).

Selanjutnya isi tabung segera divortex dan dibiarkan kembali selama 10 menit pada suhu kamar. Larutan dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Konsentrasi kolesterol ditentukan berdasarkan kurva standar. Selisih konsentrasi kolesterol yang terdeteksi pada sampel yang diinokulasi dengan BAL isolat ASI dan kontrol (tidak diinokulasi dengan BAL isolat ASI) dinyatakan sebagai kolesterol yang diasimilasi oleh BAL dalam µg/ml.

**Uji dekonjugasi natrium taurokolat (Usman dan Hosono, 1999)**

Natrium taurokolat digunakan sebagai asam empedu terkonjugasi. Pengujian dekonjugasi natrium taurokolat dilakukan dengan menggunakan medium cair MRS yang disuplementasikan dengan 0,2% natrium tioglikolat dan 0,2% natrium taurokolat. Medium cair tersebut diinokulasikan dengan kultur BAL sebanyak 1% dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam dan selanjutnya dianalisis jumlah asam kolat bebas yang dilepaskannya.

Analisis asam kolat bebas dilakukan dengan teknik berikut ini. Sebanyak 20 ml kultur diatur pHnya pada 7,0 dengan NaOH 1N. Kemudian volumenya ditepatkan menjadi 25ml dengan akuades dan disentrifugasi pada 12000 x g selama 10 menit pada suhu 1°C untuk memisahkan sel. 15 mililiter supernatan yang dihasilkan ditepatkan pHnya menjadi pH 1 menggunakan HCl 10N dan selanjutnya ditepatkan menjadi 24ml menggunakan akuades. Tiga ml sampel dan 9 ml etil asetat 99,5% ditempatkan pada tabung berpenutup kaca, campuran dicampur rata dan dibiarkan sampai terjadi pemisahan fase. Tiga ml lapisan etil asetat dari tiap tabung kemudian dipindahkan pada tabung lain dan dievaporasikan sampai kering pada suhu 60°C dengan aliran gas nitrogen. Setelah penambahan 1ml NaOH 0,1N, ditambahkan juga 6ml 16N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan 1ml furfuraldehid 1% (wt/vol) dan dicampur rata. Tabung kemudian dipanaskan pada suhu 65°C selama 13 menit dan didinginkan sampai suhu kamar, 5ml asam asetat glasial kemudian ditambahkan dan dicampur rata. Selanjutnya diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang 660nm menggunakan spektrofotometer. Konsentrasi asam kolat bebas ditentukan menggunakan kurva standar. Medium yang tidak diinokulasi bakteri digunakan sebagai kontrol. Hasil pengukuran dihitung dalam satuan µmol asam kolat per ml.

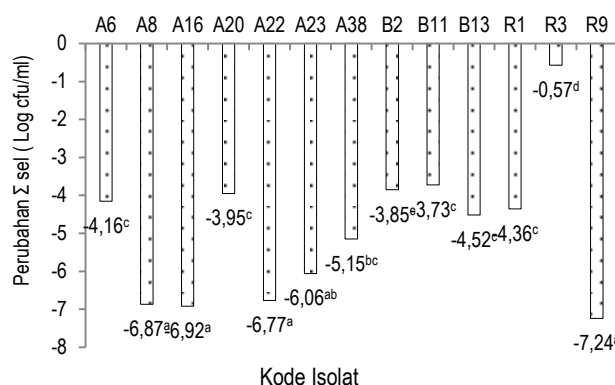
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Ketahanan BAL Isolat ASI terhadap pH rendah**

Salah satu syarat mikroorganisme dikatakan sebagai probiotik adalah kemampuannya untuk dapat bertahan dalam kondisi saluran pencernaan seperti ketahanan terhadap pH rendah dan garam empedu. Menurut Wildman dan Medeiros (2000) lambung memiliki pH sekitar 2. Uji ketahanan terhadap pH rendah diperlukan untuk mengetahui kemampuan kultur BAL isolat ASI untuk dapat bertahan terhadap asam lambung.

Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa semua isolat mengalami penurunan jumlah sel setelah inkubasi 5 jam pada pH 2. Nilai penurunan tersebut berbeda untuk setiap isolat dengan kisaran penurunan sebesar 0,57-7,24 log cfu/ml. Dari 13 isolat BAL yang diuji, hanya isolat *Leuconostoc* R3 yang mengalami penurunan jumlah sel kurang dari 1 unit log (paling tahan). Nilai ini berbeda nyata (p<0,05) dengan nilai perubahan jumlah sel pada isolat lainnya berdasarkan hasil analisis statistik. Perubahan jumlah sel yang berbeda pada semua isolat yang diuji menunjukkan bahwa kemampuan untuk bertahan pada kondisi asam berbeda untuk setiap isolat. Kemampuan ini bersifat *strain dependent*. Hal ini kemungkinan terjadi karena perbedaan membran sitoplasma setiap bakteri. Keragaman

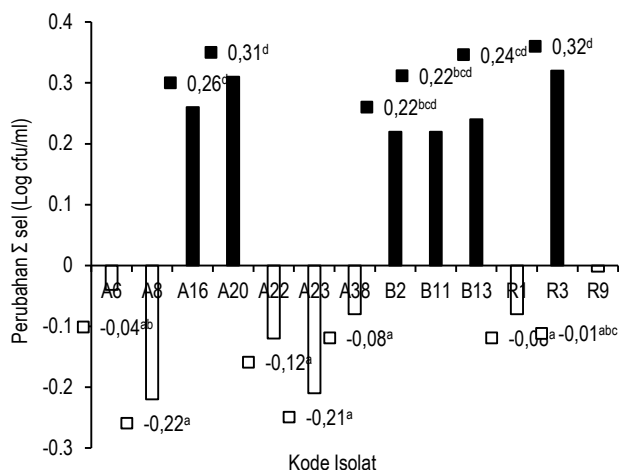
tersebut mempengaruhi karakteristik serta permeabilitas membran. Cotter dan Hill (2003) menyebutkan bahwa perbedaan toleransi asam pada beberapa spesies BAL asal oral berhubungan dengan permeabilitas relatifnya terhadap proton. Permeabilitas sel terhadap proton salah satunya ditentukan melalui aliran proton keluar yang aktif (*active outflow*) yang dilakukan melalui ATPase membran translokasi proton. Perbedaan pH optimum enzim ATPase masing-masing bakteri akan menentukan permeabilitas proton masing-masing bakteri tersebut. Semakin rendah pH optimum enzim tersebut maka toleransi bakteri terhadap asam akan lebih baik. Cotter dan Hill (2003) juga menyebutkan bahwa beberapa BAL dapat menginduksi respon toleransi asam (*acid tolerance response*) terhadap perlakuan asam yang ringan. Respon tersebut akan menginduksi sistem pH homeostatis, perlindungan dan mekanisme perbaikan.



Gambar 1. Perubahan jumlah BAL isolat ASI setelah inkubasi pada media yang memiliki pH 2 selama 5 jam (angka-angka yang diikuti oleh huruf *superscript* yang sama menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada uji Duncan (p>0,05))

**Ketahanan BAL isolat ASI terhadap garam empedu**

Derajat toleransi terhadap garam empedu merupakan karakteristik yang penting bagi BAL karena hal tersebut berpengaruh terhadap aktivitasnya dalam saluran pencernaan. Gambar 2 menunjukkan perubahan jumlah sel pada semua bakteri isolat ASI yang ditumbuhkan pada media yang mengandung garam empedu (0,5% oxgall). Dari 13 isolat yang diuji, sebanyak 6 isolat mengalami penambahan jumlah sel setelah inkubasi selama 24 jam dengan kisaran 0,22-0,32 log cfu/ml. Sebaliknya, 7 isolat lainnya mengalami penurunan jumlah sel dengan kisaran 0,01-0,22 log cfu/ml. *Leuconostoc* R3, *Pediococcus pentosaceus* 1-A20, dan *Pediococcus pentosaceus* 2-A16 merupakan isolat yang mempunyai ketahanan paling tinggi terhadap garam empedu jika dibandingkan dengan isolat lainnya berdasarkan analisis statistik. Isolat-isolat ini mampu tumbuh setelah inkubasi 24 jam dengan penambahan jumlah sel masing-masing sebesar 0,26, 0,31, dan 0,32 log cfu/ml. Namun, penambahan jumlah sel tersebut tidak berbeda nyata (p>0,05) dengan penambahan jumlah sel isolat *Pediococcus pentosaceus* 2-B11, *Pediococcus pentosaceus* 2-B2, dan *Pediococcus pentosaceus* 2-B13.



Gambar 2. Perubahan jumlah BAL isolat ASI setelah inkubasi pada media yang mengandung 0.5% garam empedu selama 24 jam (angka-angka yang diikuti oleh huruf *superscript* yang sama menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada uji Duncan ( $p>0,05$ ))

Cairan empedu merupakan campuran dari asam empedu, kolesterol, asam lemak, fosfolipid, pigmen empedu, dan sejumlah xenobiotik terdetoksifikasi. Kombinasi tersebut bersifat bakterisidal bagi mikroorganisme komensal dalam tubuh manusia, kecuali bagi beberapa genus penghuni usus yang tahan terhadap empedu (Hill, 1995). Perbedaan ketahanan pada isolat-isolat yang diuji menunjukkan bahwa ketahanan terhadap garam empedu bersifat *strain dependent*. Kimoto-Nira *et al.* (2007) melaporkan bahwa terdapat hubungan antara komposisi asam lemak setiap bakteri dengan kemampuannya untuk dapat bertahan terhadap garam empedu. Perbedaan komposisi asam lemak pada setiap bakteri inilah yang mungkin menjadi penyebab perbedaan ketahanan pada bakteri-bakteri tersebut.

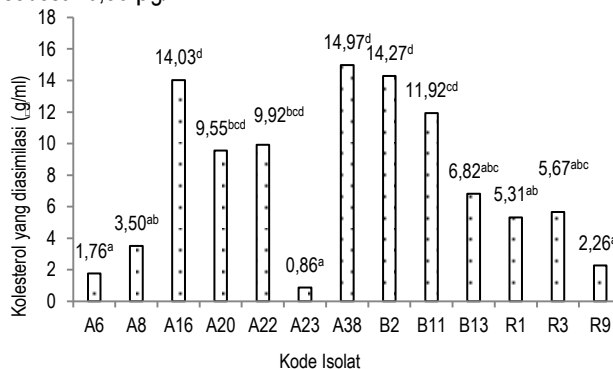
**Asimilasi kolesterol**

Kemampuan mengasimilasi kolesterol merupakan salah satu karakteristik BAL yang dapat digunakan untuk melakukan seleksi terhadap kultur yang akan dikembangkan sebagai probiotik penurun kolesterol. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Gilliland *et al.* (1985), proses asimilasi hanya terjadi jika kultur ditumbuhkan secara anaerobik dengan adanya garam empedu pada media pertumbuhannya. Jumlah garam empedu yang dibutuhkan agar kultur mampu mengambil kolesterol dari medium pertumbuhan setara dengan jumlah garam empedu yang secara normal terdapat di dalam usus.

Dalam penelitian ini, media yang digunakan mengandung 0,3% garam oxgall sebagai garam empedu dan 0,2% natrium tioglikolat untuk menciptakan kondisi anaerob (Kimoto *et al.*, 2002), sehingga mendekati kondisi di dalam usus. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ketiga belas kultur bakteri asam laktat isolat ASI yang diuji memiliki kemampuan untuk mengasimilasi kolesterol secara *in vitro*.

Jumlah kolesterol yang diasimilasi oleh setiap kultur berbeda-beda dengan kisaran 0,86-14,97 µg/ml, seperti yang terlihat pada Gambar 3. *Pediococcus pentosaceus* 1-A38, *Pediococcus pentosaceus* 2-B2, dan *Pediococcus pentosaceus*

2-A16 merupakan isolat dengan aktivitas asimilasi terbesar, yaitu masing-masing 14,97, 14,27, dan 14,03 µg/ml. Adapun isolat yang memiliki aktivitas asimilasi terendah yaitu *Pediococcus pentosaceus* 1-A23 dengan aktivitas asimilasi sebesar 0,86 µg/ml.



Gambar 3. Jumlah kolesterol yang diasimilasi oleh BAL isolat ASI setelah inkubasi 20 jam pada suhu 37°C (angka-angka yang diikuti oleh huruf *superscript* yang sama menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada uji Duncan ( $p>0,05$ ))

Dilihat dari jenis bakteri berdasarkan aktivitas metabolismenya, baik bakteri homofermentatif maupun heterofermentatif keduanya dapat mengasimilasi kolesterol. Dari hasil penelitian ini juga terlihat bahwa keragaman aktivitas asimilasi kolesterol tidak berhubungan dengan perbedaan spesies tertentu akan tetapi tergantung dari masing-masing strain (*strain dependent*). Perbedaan dalam pengikatan kolesterol tersebut kemungkinan dipengaruhi oleh sifat kimia dan struktural dari peptidoglikan dinding sel masing-masing strain yang mengandung asam amino yang mampu mengikat kolesterol (Kimoto-Nira *et al.*, 2007).

Besarnya aktivitas asimilasi pada isolat-isolat yang diuji dalam penelitian ini tergolong rendah jika dibandingkan dengan aktivitas asimilasi pada bakteri yang telah diuji sebelumnya oleh beberapa peneliti, yaitu berkisar antara 8,2-42,68 µg/ml (Gilliland *et al.* (1985); Buck dan Gilliland (1994); Noh *et al.* (1997); Kusumawati (2002); Ngatirah *et al.* (2000); Kimoto *et al.* (2002); Liong dan Shah (2005)).

Menurut Kusumawati (2002), perbedaan kemampuan mengasimilasi kolesterol mungkin juga disebabkan oleh perbedaan sumber kolesterol yang digunakan dalam pengujian. Gilliland *et al.* (1985) menggunakan fraksi serum *pleuropneumonia like organism* (PPLO) sebagai sumber kolesterol, Buck dan Gilliland (1994) dan Noh *et al.* (1997) menggunakan misel kolesterol-fosfatidilkolin, sedangkan Liong dan Shah (2005) menggunakan *polioxyethanyl cholesteryl* (kolesterol larut air) sehingga memiliki kelarutan yang baik dalam media yang digunakan untuk pengujian (MRSB).

Adapun sumber kolesterol yang digunakan dalam penelitian ini adalah kolesterol murni, seperti pada penelitian yang dilakukan Ngatirah *et al.* (2000) dan Kusumawati (2002). Menurut Kusumawati (2002), kolesterol murni tidak dapat larut dengan baik pada media MRSB yang merupakan media berbasis air, karena kelarutan kolesterol dalam air sangat

rendah. Hal tersebut mungkin berpengaruh terhadap jumlah kolesterol yang dapat diasimilasi oleh bakteri.

Jika dikaitkan dengan ketahanan masing-masing isolat terhadap garam empedu (Gambar 2), berdasarkan hasil analisis statistik (uji korelasi Pearson) tidak ada hubungan yang signifikan ( $p > 0,05$ ) antara kemampuan asimilasi kolesterol dengan ketahanan terhadap garam empedu (koefisien korelasi linier = 0,466). Hal ini menunjukkan hubungan yang lemah antara ketahanan terhadap garam empedu dengan kemampuan mengasimilasi kolesterol.

Isolat yang memiliki ketahanan tinggi terhadap garam empedu belum tentu memiliki kemampuan yang tinggi dalam mengasimilasi kolesterol. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Usman dan Hosono (1999), dimana tidak ada hubungan yang signifikan antara ketahanan terhadap garam empedu pada *Lactobacillus gasserii* dengan kemampuannya dalam mengikat kolesterol.

Pereira dan Gibson (2002) melaporkan bahwa *L. johnsonii* memiliki ketahanan yang lebih tinggi terhadap garam empedu dibanding *L. casei shirota*, namun *L. johnsonii* tidak dapat mengasimilasi kolesterol sebanyak yang diasimilasi oleh *L. casei shirota*.

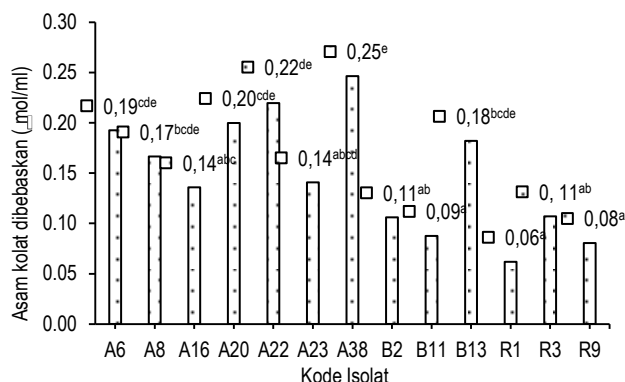
Dalam proses asimilasi, diduga sebagian kolesterol yang diambil oleh sel bakteri bergabung dengan membran seluler bakteri tersebut. Penelitian yang dilakukan Noh *et al.* (1997) mengindikasikan bahwa kolesterol telah mengubah dinding sel atau membran seluler lactobacilli sehingga lebih tahan terhadap gangguan sonikasi. Kimoto *et al.* (2002) menemukan perbedaan pola distribusi asam lemak pada sel yang tumbuh pada media yang mengandung kolesterol dan yang tidak mengandung kolesterol. Diduga kolesterol bergabung ke dalam membran sel dan mengubah komposisi asam lemak dalam sel.

### Dekonjugasi Natrium Taurokolat

Dekonjugasi garam empedu oleh enzim *bile salt hidrolase* (BSH) yang dihasilkan oleh BAL berhubungan dengan penurunan kolesterol dalam darah. Chikai *et al.* (1987). menerangkan bahwa dekonjugasi asam empedu dapat membantu menurunkan kadar kolesterol pada manusia karena asam empedu terdekonjugasi dikeluarkan lebih cepat daripada bentuk terkonjugasi. Dalam penelitian ini dilakukan pengujian dekonjugasi natrium taurokolat sebagai sumber garam empedu terkonjugasi. Natrium taurokolat merupakan bentuk utama garam empedu di dalam tubuh manusia dan karnivora (Uchida *et al.* 1977).

Hasil uji dekonjugasi natrium taurokolat isolat BAL menunjukkan bahwa isolat-isolat BAL memiliki daya dekonjugasi natrium taurokolat yang relatif lemah. Hal ini ditunjukkan dengan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 660nm yang rendah dan tidak nampak berbeda dengan kontrol (tanpa inokulasi bakteri).

Hasil perhitungan nilai absorbansi menunjukkan bahwa isolat-isolat BAL asal ASI hanya memiliki kemampuan dekonjugasi natrium taurokolat (membebaskan asam kolat) sebesar 0,06-0,25  $\mu\text{mol}$  asam kolat/ml kultur (Gambar 4), dengan kemampuan terbesar pada isolat *Pediococcus pentosaceus* 1-A38 dan *Pediococcus pentosaceus* 1-A22.



Gambar 4. Jumlah asam kolat yang dibebaskan oleh BAL isolat ASI setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C (angka-angka yang diikuti oleh huruf *superscript* yang sama menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata pada uji Duncan ( $p > 0,05$ ))

Hasil pengujian tersebut di atas menunjukkan bahwa kemampuan isolat BAL asal ASI tergolong lemah. Usman dan Hosono (1999) meneliti kemampuan dekonjugasi natrium taurokolat 28 isolat *L. gasserii*, hasilnya menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut dapat mendekonjugasi natrium taurokolat dan membebaskan asam kolat dalam kisaran 1,24-1,94  $\mu\text{mol/ml}$ . Pato *et al.* (2005) meneliti kemampuan dekonjugasi asam taurokolat oleh isolat BAL yang berasal dari dadih. Ditemukan bahwa enam isolat mampu mendekonjugasi asam taurokolat dengan membebaskan asam kolat, aktivitas dekonjugasi berkisar antara 0,21  $\mu\text{mol/ml}$  (oleh *L. lactis* subsp. *lactis* I-2775) sampai dengan 0,45  $\mu\text{mol/ml}$  (oleh *L. lactis* subsp. *lactis* K-5).

Gilliland dan Speck (1977) mengukur daya dekonjugasi beberapa isolat *Lactobacillus* secara kualitatif terhadap dua jenis garam empedu yaitu taurokolat dan glikokolat, hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa 19 dari 36 isolat dapat mendekonjugasi glikokolat, sedangkan 11 dari 36 isolat diketahui mampu mendekonjugasi taurokolat.

Mandal *et al.* (2009) meneliti aktivitas dekonjugasi garam empedu dan potensi hipokolesterolemik isolat BAL dari jenis *Pediococcus acidilactici*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Pediococcus acidilactici* LAB 5 memiliki aktivitas dekonjugasi garam empedu. Pemberian sinbiotik berupa *P. acidilactici* LAB 5 dan sorbitol selama 1 bulan mampu menurunkan kolesterol plasma darah mencit (*swiss albino mice*) (176,34  $\mu\text{g/ml}$ ) dibanding dengan kontrol (208,76  $\mu\text{g/ml}$ ).

Kemampuan dekonjugasi garam empedu diduga menjadi faktor yang memungkinkan suatu isolat dapat memiliki ketahanan terhadap garam empedu. Proses dekonjugasi mungkin menurunkan tingkat toksisitas dari garam empedu terkonjugasi terhadap bakteri (De Smet *et al.*, 1995). Akan tetapi pada penelitian ini ditemukan bahwa tidak terdapat hubungan yang signifikan antara ketahanan suatu isolat terhadap garam empedu dengan kemampuannya mendekonjugasi garam empedu.

Koefisien korelasi linear antara kemampuan dekonjugasi natrium taurokolat dengan ketahanan terhadap garam empedu

adalah sebesar sebesar -0,205. Demikian juga, tidak ada korelasi antara kemampuan dekonjugasi natrium taurokolat dengan ketahanan terhadap pH rendah (koefisien korelasi linear=-0,190). Hal ini menunjukkan hubungan yang lemah antara ketahanan terhadap pH dan garam empedu dengan kemampuan dekonjugasi natrium taurokolat. Nilai koefisien korelasi linier yang negatif menunjukkan kecenderungan hubungan yang berbanding terbalik antara ketahanan terhadap pH rendah dan garam empedu.

## KESIMPULAN

Sebanyak 13 isolat BAL asal ASI memiliki ketahanan yang tinggi terhadap garam empedu, namun hanya satu isolat yang memiliki ketahanan tinggi terhadap pH rendah, yaitu *Leuconostoc* R3. Hasil pengujian menunjukkan bahwa 13 isolat yang diujikan memiliki kemampuan untuk mengasimilasi kolesterol yaitu pada kisaran 0,86-14,97 µg/ml. *Pediococcus pentosaceus* 1-A38, *Pediococcus pentosaceus* 2-B2 dan *Pediococcus pentosaceus* 2-A16 memiliki aktivitas asimilasi kolesterol terbesar.

Isolat BAL asal ASI memiliki daya dekonjugasi natrium taurokolat yang lemah, jumlah asam kolat yang dibebaskan berkisar antara 0,06-0,25 µmol/ml, dengan kemampuan mendekongugasi terbesar pada isolat *Pediococcus pentosaceus* 1-A38 dan *Pediococcus pentosaceus* 1-A22. Tidak ada korelasi antara ketahanan terhadap garam empedu dan pH dengan kemampuan asimilasi kolesterol atau dekonjugasi natrium taurokolat.

Berdasarkan hasil tersebut di atas, *Pediococcus pentosaceus* 1-A38 merupakan isolat yang paling potensial untuk digunakan pada pengembangan produk probiotik dengan sifat fungsional spesifik untuk menurunkan kolesterol dengan mekanisme asimilasi dan dekonjugasi garam empedu. Namun demikian kajian dalam penelitian ini terbatas pada pengujian *in vitro*, sehingga masih diperlukan kajian lebih lanjut (kajian *in vivo*) sebagai dasar aplikasi isolat ini pada pengembangan produk probiotik.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada pihak Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini melalui program Hibah Kompetensi Tahun Anggaran 2010.

## DAFTAR PUSTAKA

- Buck ML, Gilliland SE. 1994. Comparison of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. *J Dairy Sci* 77:2925-2933.
- Chikai T, Nakao H, Uchida K. 1987. Deconjugation of bile acids by human intestinal bacteria implanted in germ free rats. *Lipids* 22:669-671.
- Collado MC. 2009. Role of probiotics in health and diseases. Dalam Lee, YK dan Salminen, S (Eds.). *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Cotter PD, Hill C. 2003. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(3):429-453.
- De Smet I, Hoorde LV, Woestyne MV, Christiaens H, Verstraete W. 1995. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J App Bacteriol* 79:292-301.
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization/World Health Organization]. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in foods. Report of a Joint FAO/WHO Working Group, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1 2002.
- Gilliland SE, Speck ML. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal *Lactobacilli*. *Applied and Environmental Microbiology* 33(1):15-18.
- Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 49(2):377-381.
- Gropper SS, Smith JL, Groff JR. 2009. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. Wadsworth, USA.
- Hill MJ. 1995. Role of Gut Bacteria in Human Toxicology and Pharmacology. Taylor and Francis, New York.
- Hofmann AF. 1984. Chemistry and enterohepatic circulation of bile acids. *Hepatology* 4:4S-14S.
- Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. 2002. Cholesterol removal from media by *Lactococci*. *J Dairy Sci* 85:3182-3188.
- Kimoto-Nira H, Mizumachi K, Nomura M, Kobayashi M, Fujita Y, Okamoto T. 2007. *Lactococcus* sp. as potential probiotic lactic acid bacteria. *Japan Agricultural Research Quarterly* 41:181-189.
- Kusumawati N. 2002. Seleksi Bakteri Asam Laktat Indigenus sebagai Genus Probiotik Dengan Kemampuan Mempertahankan Keseimbangan Mikroflora Feses dan Mereduksi Kolesterol Serum Darah Tikus. Tesis. Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Liong MT, Shah NP. 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains. *J Dairy Sci* 88:55-66.
- Lye HS, Ali GRR, Liong MT. 2010. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *Int Dairy J* 20:169-175.
- Mandal V, Sen SK, Mandal NC. 2009. Effect of prebiotics on bacteriocin production and cholesterol lowering activity of *Pediococcus acidilactici* LAB 5. *World J Microbiol Biotechnol* 25(10):1837-1847.
- Ngatirah, Harmayani E, Rahayu ES, Tyas U. 2000. Seleksi bakteri asam laktat agensia probiotik yang berpotensi menurunkan kolesterol. Seminar Nasional Industri Pangan. PATPI. Surabaya, 10-11 Oktober 2000.
- Noh DO, Kim SH, Gilliland SE. 1997. Incorporation cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J Dairy Sci* 80:3107-3113.

- Nuraida L, Susanti, Hartanti AW. 2007. Lactic acid bacteria and Bifidobacteria profile of breast milk and their potency as probiotics. 10<sup>th</sup> ASEAN Food Conference. Food for Mankind-Contribution of Science and Technology. 21-23 August. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Pato U, Ali M, Parlindungan AK. 2005. Taurocholate deconjugation and cholesterol binding by indigenous dadih lactic acid bacteria. *Hayati* 12(3):103-107.
- Pereira DI, Gibson GR. 2002. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37(4):259-81.
- Uchida K, Okuno I, Takse H, Nomura Y, Kadowaki M. 1977. Distribution of bile acids in rats. *Lipids* 13:42-48.
- Usman, Hosono A. 1999. Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* Strains. *J Dairy Sci* 82: 243-248.
- Wildman REC, Medeiros DM. 2000. *Advanced Human Nutrition*. CRC Press LLC., Boca Raton, New Jersey.