



Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Susu Kuda Bima (*Equus sp.*) Yang Berpotensi Sebagai Probiotik

Elsa Mega Suryani^{1*}, Affan Gaffar²

¹ Prodi Mikrobiologi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Maarif Hasyim Latif, Sidoarjo 61257 Indonesia

² Prodi Teknologi Pangan, Institut Teknologi dan Kesehatan Aspirasi, Lombok Timur, NTB, Indonesia

*Koresponden Penulis : elsamega.syn@dosen.umaha.ac.id

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari susu kuda yang berpotensi sebagai probiotik. Identifikasi bakteri meliputi pewarnaan gram, uji aktivitas antimikroba, uji aktivitas hemolitik, uji toleransi terhadap pH dan garam empedu. Hasil penelitian menunjukkan isolat C5 yang diisolasi dari sampel susu kuda memiliki potensi sebagai probiotik. Karakterisasi meliputi bentuk bakteri basil, memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* ATCC sebesar 0,40 mm, bersifat gamma (γ) hemolisis, toleransi terhadap pH 2, 3, 5 dan toleransi terhadap garam empedu 0,4-1%.

Kata kunci: susu kuda, bakteri asam laktat, probiotik

ABSTRACT

The aim of this research is to isolate and characterize lactic acid bacteria from mare's milk which have the potential to act as probiotics. Bacterial identification includes gram staining, antimicrobial activity test, hemolytic activity test, pH and bile salt tolerance test. The research results showed that C5 isolates isolated from horse milk samples had potential as probiotics. Characterization includes the form of bacillary bacteria, antimicrobial activity against the pathogenic bacteria *Escherichia coli* ATCC of 0.40 mm, gamma (γ) hemolysis, tolerance to pH 2, 3, 5 and tolerance to bile salts of 0.4-1%.

Key words: mare's milk, lactic acid bacteria, probiotics

doi: 10.33474/e-jbst.v9i2.561

Diterima tanggal 22 November 2023 – Diterbitkan Tanggal 29 Januari 2024

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>



Pendahuluan

Susu dikenal sebagai sumber nutrisi yang penting, manusia telah mengonsumsi susu sejak ribuan tahun lalu. Produk susu dipercaya oleh masyarakat Indonesia dan global untuk meningkatkan kesehatan tubuh. Masyarakat mengonsumsi susu dari beberapa hewan seperti sapi, kambing, unta, kuda, dan banteng [1]. Berdasarkan spesies hewan penghasil susu dikategorikan menjadi spesies pemerahan mayor dan minor. Spesies pemerah susu mayor diantaranya sapi dan kerbau, sedangkan pemerah susu minor seperti domba, kambing, unta, dan kuda. Penelitian dan pengembangan produk susu mayor telah banyak diteliti, namun produk susu minor salah satunya susu kuda dari Sumbawa informasinya terbatas.

Kandungan gizi susu kuda memiliki asam amino diantaranya aspartat, glutamat, serin, glicin, histidin, agrinin, tironin, alanin, prolin, tirosin, valin, metionin, sistein, leucine dan lisin [2]. Dibandingkan dengan susu sapi dan kambing, susu kuda memiliki lisozim dan laktoferin yang lebih tinggi sehingga mempengaruhi umur simpannya. Susu kuda dapat bertahan dalam suhu ruang selama 1 bulan [3]. Selain itu susu kuda memiliki sifat antibakteri [4] dan dilaporkan mengandung bakteri asam laktat (BAL) [5].

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan bakteri gram positif yang berspora, berbentuk batang, dapat memfermentasi glukosa dan menghasilkan asam laktat sebagai produk dari proses fermentasi [6]. Laktosa pada susu yang difermentasi oleh mikroorganisme menghasilkan metabolit utama berupa asam laktat yang mengakibatkan susu menjadi asam [7].

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang jika dikonsumsi dalam jumlah tertentu akan memberikan manfaat bagi pencernaan, bakteri hidup yang diinokulasikan pada makanan untuk dikonsumsi sehingga dapat memberikan efek memperbaiki keseimbangan bakteri didalam saluran pencernaan. Umumnya bakteri probiotik adalah golongan dari bakteri asam laktat (BAL). Bakteri asam laktat (BAL) merupakan jenis bakteri penting yang banyak dimanfaatkan dalam industri manufaktur makanan, susu, probiotik, dan minuman. Umumnya dianggap aman, memiliki toleransi yang tinggi terhadap pH rendah dan memiliki fitur unik yang menjadikannya ideal untuk diaplikasikan atau dikonsumsi [8]. Oleh karena itu tujuan dari penelitian ini adalah isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari susu kuda (*Equus sp.*) yang berpotensi sebagai probiotik.

Material dan Metode

Isolasi Bakteri Asam Laktat

Sampel yang digunakan yaitu susu kuda bima, masing-masing dilakukan 3 kali ulangan. Tiap sampel 500 mL diperoleh dalam keadaan dingin. Isolasi BAL dilakukan dengan menggunakan *serial dilution* yaitu dengan mengambil 25 ml sampel susu dilarutkan ke dalam 225 ml NaCl 0,85% steril. Sampel sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam 9 ml tabung reaksi berisi NaCl 85% steril. Pengenceran dilakukan hingga 10^{-6} , kemudian 0,1 ml dari setiap tabung rekasi diambil, dimasukkan kedalam cawan petri, dan ditambahkan medium *de Man Rogosa Sharpe* (MRS) Agar yang telah dicampur dengan CaCO_3 1% kemudian diinkubasi 37°C selama 48 jam [9].

Koloni yang tumbuh dan membentuk zona bening dimurnikan menggunakan metode *streak plate*. Isolat murni yang diperoleh disubkultur pada media agar miring. Isolat murni tersebut selanjutnya dilakukan karakterisasi sel BAL melalui dengan pewarnaan gram bakteri. Bakteri gram positif ditandai dengan warna ungu (atau biru) yang menunjukkan bahwa dinding sel bakteri mampu berikatan dengan pewarna kristal violet, sedangkan bakteri gram negatif ditandai oleh pembentukan warna merah muda menunjukkan bahwa dinding sel bakteri tidak dapat mengikat pewarna kristal violet, dan hanya ternoda oleh pewarna safranin (sebagai pewarna pembanding) [10].



Karakterisasi BAL yang berpotensi sebagai probiotik Uji Aktivitas Antimikroba

Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antimikroba menggunakan *well diffusion method*. Kultur bakteri patogen sebanyak 1 ose ditumbuhkan dalam 9 ml Nutrient Broth (NB). Bakteri patogen yang digunakan yaitu *Escherichia coli* ATCC25922 di media Nutrient agar (NA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jumlah sel masing-masing kultur bakteri patogen dan BAL yang digunakan untuk uji ini adalah 10^7 CFU/ml. Media Nutrient Agar (NA) dituangkan ke dalam cawan dan dibiarkan memadat pada suhu ruang, kemudian sebanyak 0,1 ml masing-masing isolat patogen diinokulasikan ke dalam media Nutrient Agar (NA), dilakukan *spread plate* dan dibiarkan selama 8 menit. Setelah itu, dibuat sumuran dengan menggunakan *cork borer* dan ditambahkan 100 μ L kultur masing-masing BAL di setiap lubang tersebut [11]. Kultur tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam dan diukur zona bening yang terbentuk menggunakan penggaris. Setiap perlakuan diulang 3 kali.

Uji Haemolitik

Isolat BAL umur 24 jam digoreskan dalam media blood agar yang mengandung darah ayam, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Diamati aktivitas haemolitiknya yaitu β -Haemolysis (zona bening), α -haemolysis (zona berwarna hijau disekeliling koloni) dan γ -haemolysis (tidak ada zona) [12].

Uji toleransi BAL terhadap pH dan garam empedu

Jumlah sel yang digunakan dalam perlakuan adalah 10^8 CFU/mL. Inokulum BAL ditambahkan 10 % dalam media MRS broth dengan variasi pH 2, 4, dan 5 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, kultur tersebut dihitung jumlah selnya dengan metode *Total Plate Count* (TPC) [13]. Uji toleransi garam empedu dengan menggunakan media MRS broth yang mengandung 0,4%, 0,8%, 1%, dan 5% oxgall. Inokulum tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam dan dihitung jumlah selnya dengan metode TPC. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali [14].

Analisis Data

Data hasil karakterisasi yang berpotensi sebagai probiotik dianalisis menggunakan *One Way Anova* pada software SPSS 16.0. Uji lanjut Tukey digunakan untuk membandingkan karakter setiap isolat dalam setiap perlakuan untuk memperoleh BAL yang berpotensi sebagai probiotik. Masing-masing perlakuan diuji statistik dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil analisis disajikan dalam bentuk grafik menggunakan Ms. Excel 2017.

Hasil dan Diskusi

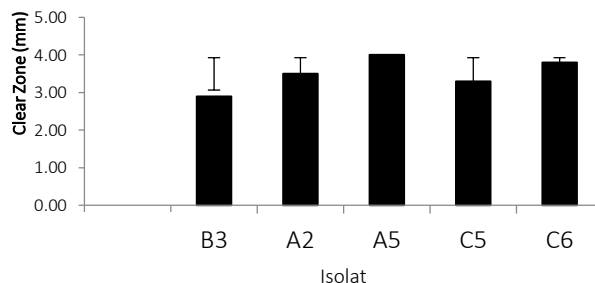
Karakter isolat bakteri asam laktat

Isolasi BAL dilakukan dengan menggunakan media selektif MRSA yang bertujuan mengoptimalkan pertumbuhan dan mendapatkan koloni BAL. Jumlah isolat BAL hasil isolasi adalah 10 isolat. Diversitas masing-masing isolat bakteri yaitu ciri koloni bakteri berbentuk batang pendek, elevasi cembung, dan berwarna putih yang diduga merupakan koloni BAL. Hal ini sesuai dengan penelitian [15] Mailoa et al., (2021) bahwa isolat BAL dari susu kuda memiliki ciri bentuk sel batang pendek dan panjang, elevasi cembung dan berwarna putih.

Karakter semua BAL adalah gram positif terdiri dari 6 isolat A5, B3, B4, B5, C5, C6 bentuk bakteri kokus ukuran sekitar 0,5-1,4 μ m, sedangkan 4 isolat A2, A4, C4, A6 bentuk bakteri basil ukuran sekitar 0,9-2,1 μ m.

Aktivitas antimikroba

Karakter BAL yang berpotensi sebagai probiotik adalah mempunyai aktivitas antimikroba. Bakteri patogen yang digunakan adalah *Escherichia coli* ATCC yang menyebabkan penyakit hemoragik dan keracunan makanan bagi manusia. Aktivitas antimikroba BAL terhadap *Escherichia coli* ATCC yang paling tinggi adalah isolat C5, B3, A2, A5, C6 dengan urutan indeks penghambatannya berturut-turut adalah 4,0 mm; 3,8 mm; 3,5 mm; 3,3 mm; 2,9 mm (Gambar 1). Zona hambat <6 mm dikategorikan aktivitas antimikroba rendah, jika >6 mm aktivitas antimikroba tinggi [16].



Gambar 1. Zona hambat BAL terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* strain ATCC

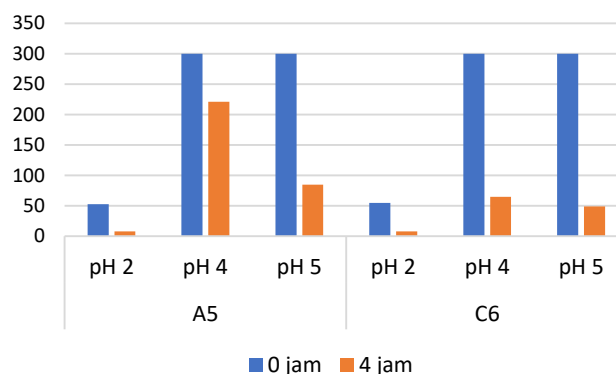
Susu kuda mempunyai aktivitas antimikroba dengan spektrum yang cukup luas [17]. Aktivitas antimikroba berhubungan dengan BAL menghasilkan beberapa metabolit antimikroba seperti asam organik (asam laktat, asam asetat, asam propionat), hidrogen peroksida dan bakteriosin [18]. Penelitian lainnya mengungkapkan bahwa aktivitas antimikroba bergantung pada spesies dan strain [19,20].

Aktivitas Hemolitik

Hasil penelitian yaitu semua isolat A2, A5, B3, C5, C6 tidak menghasilkan zona bening (gamma hemolisis). Contoh BAL yang non hemolisis adalah *Bacillus* spp. [21]. Bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai probiotik tidak mempunyai aktivitas hemolitik. Hemolisis adalah kerusakan sel darah merah. Ada 3 jenis hemolisis yaitu Beta hemolisis (β) atau biasa disebut hemolisis total, Alpha hemolisis (α) disebut juga hemolisis sebagian, dan Gamma hemolisis (γ) disebut juga non hemolisis. Bakteri asam laktat pada umumnya tidak mempunyai aktivitas hemolitik karena tidak menghasilkan hemolisin [22].

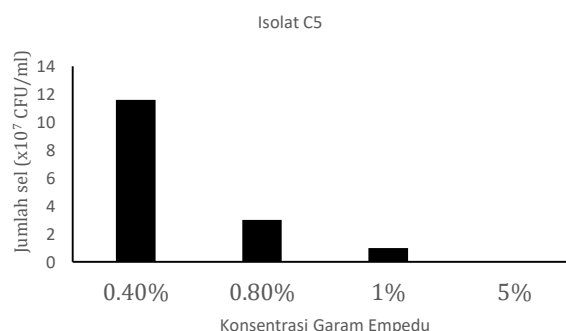
Toleransi terhadap pH dan garam empedu

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat A5 dan C6 toleransi terhadap pH 2, 4, dan 5. Perlakuan pH 2, penurunan jumlah sel A5 berbeda nyata karena jumlah sel hari ke-0 atau kontrol sebanyak 53×10^7 CFU/ml, dan setelah inkubasi selama 4 jam penurunan jumlah sel menjadi 8×10^7 CFU/ml. Isolat C6 penurunan jumlah sel hari ke-0 atau kontrol sebanyak 113×10^7 CFU/ml, dan setelah inkubasi selama 4 jam penurunan jumlah sel menjadi 8×10^7 CFU/ml. Isolat A5 pada pH 4 dan pH 5, jumlah sel pada perlakuan kontrol sebanyak 300×10^7 , setelah inkubasi 4 jam jumlah sel menjadi 221×10^7 dan 85×10^7 . Isolat C6 pada pH 4 dan pH 5, jumlah sel pada perlakuan kontrol sebanyak 300×10^7 . Setelah inkubasi 4 jam jumlah sel menjadi 119×10^7 dan 53×10^7 . Hasil uji toleransi pH menunjukkan isolat A5 memiliki toleransi yang lebih baik dibandingkan dengan isolat C6 (Gambar 2).



Gambar 2. Toleransi Isolat BAL terhadap pH.

Pengujian garam empedu dengan konsentrasi 0,4%, 0,8%, 1% dan 5% dihasilkan isolat C5 toleransi terhadap garam empedu 0,4-1% dan tidak mampu bertahan hidup di konsentrasi 5% (Gambar 3). Bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai probiotik harus toleransi terhadap pH dan garam empedu inangnya [23].



Gambar 3. Toleransi Isolat BAL terhadap konsentrasi garam empedu.

Pemilihan bakteri probiotik dari susu kuda karena dapat bertahan hidup disaluran pencernaan manusia dan memberi manfaat kesehatan. Isolat BAL yang diteliti dikarakterisasi untuk mengetahui tingkat toleransi asam dan empedu. Hal ini untuk memeriksa viabilitas dibawah kondisi pH gastrointestinal. Toleransi garam empedu membantu dalam mengevaluasi kemampuan bakteri dapat kolonisasi di usus kecil dan menempel pada sel epitel [24].

Manfaat kesehatan dari BAL sebagai probiotik seperti menurunkan resiko penyakit radang usus [25], mengatur respons alergi [26], menghambat pertumbuhan bakteri patogen, dan meningkatkan nilai gizi [27]. Selain itu BAL berpotensi sebagai pengawet dan kultur starter alami pada makanan [28,29].

Kesimpulan

Isolat C5 berpotensi sebagai kandidat probiotik karena memenuhi kriteria probiotik. Kriteria tersebut adalah mempunyai aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* ATCC, tidak mempunyai aktivitas hemolitik, toleransi terhadap pH 2-5 dan toleransi terhadap garam empedu 0,4-1%.



Daftar Pustaka

- [1] Kanetkar P, Paswan V K, Rose H, Shehata A M, Felix J, Bunkar D S, Rathaur A, Yamini S and Bhinchhar B K. 2023. Appraisal of some ethnic milk products from minor milch animal species around the world: a review. *J. Ethn. Foods* 10(1):1–19
- [2] Mazhitova A T, Kulmyrzaev A A, Ozbekova Z E and Bodoshev A. 2015. Amino Acid and Fatty Acid Profile of the Mare's Milk Produced on Suusamyr Pastures of the Kyrgyz Republic During Lactation Period. *Procedia - Soc. Behav. Sci.* 195 :2683–2688
- [3] Nurliyani F A and I. 2015. Change of Mare Milk Quality During Storage at Room Temperature. *Pakistan J. Nutr.* 14(10):642–646
- [4] Nur Laili F, Prawita Setyowati E and Iravati S. 2014. Sumbawa Horse Milk Typical Indonesian Antibacterial Cosmetic Ingredients Against Acne (*Staphylococcus epidermidis*) Susu Kuda Sumbawa Khas Indonesia Bahan Kosmetik Antibakteri Jerawat (*Staphylococcus epidermidis*). *Tradit. Med. J.* 19(2):74–79
- [5] Kusdianawati, Mustopa A Z, Fatimah and Budiarto B R. 2020. Genetic diversity of lactic acid bacteria isolated from Sumbawa Horse Milk, Indonesia. *Biodiversitas* 21(7):3225–3233
- [6] Mokoena M P, Omatola C A and Olaniran A O. 2021. Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens. *Molecules* 26:1-13
- [7] Sharma R, Garg P, Kumar P, Bhatia S K and Kulshrestha S. 2020. Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods. *Fermentation* 6(4) :1–20
- [8] Ağagündüz D, Yılmaz B, Şahin T Ö, Güneşliol B E, Ayten Ş, Russo P, Spano G, Rocha J M, Bartkiene E and Özogul F. 2021. Dairy lactic acid bacteria and their potential function in dietetics: The food–gut–health axis. *Foods* 10(12):1–33
- [9] Bamgbose T S S. 2014. Isolation and Characterisation of Microbes Producing Bacteriocin from Curd, Raw Milk and Soil and its Preservative Effects. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 5(5):1942–1948
- [10] Ismail Y S, Yulvizar C and Mazhitov B. 2018. Characterization of lactic acid bacteria from local cows milk kefir. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 130(1):1-8
- [11] Fontana C, Cocconcelli P S, Vignolo G and Saavedra L. 2015. Occurrence of antilisterial structural bacteriocins genes in meat borne lactic acid bacteria. *Food Control* 47:53–59
- [12] Yasmin I, Saeed M, Khan W A, Khaliq A, Chughtai M F J, Iqbal R, Tehseen S, Naz S, Liaqat A, Mehmood T, Ahsan S and Tanweer S. 2020. In vitro probiotic potential and safety evaluation (Hemolytic, cytotoxic activity) of bifidobacterium strains isolated from raw camel milk. *Microorganisms* 8:1-21
- [13] Nawaz A S N, Jagadeesh K S and Krishnaraj P U. 2017. Isolation and Screening of Lactic Acid Bacteria for Acidic pH and Bile Tolerance. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 6(7) :3975–3980
- [14] Srikanjana Klayraung and Siriporn Okonogi. 2009. Antibacterial and Antioxidant Activities of Acid and Bile Resistant Strains of. *Brazilian J. Microbiol.* 40:757–766
- [15] Mailoa M N, Sormin R B D, Leiwakabessy J and Wattimena M L. 2021. Lactic acid bacteria profile isolated from “laor” worms (Polychaeta) fresh from Lawena Beach, Ambon Maluku. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 805(1):1-5



- [16] Arief I I, Jenie B S L, Suryati T, Ayuningtyas G and Fuziawan A. 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin from indigenous *Lactobacillus plantarum* 2C12 and its application on beef meatball as biopreservative. *J. Indones. Trop. Anim. Agric.* 37(2) :90–96
- [17] Singh A, Duche R T, Wandhare A G, Sian J K, Singh B P, Sihag M K, Singh K S, Sangwan V, Talan S and Panwar H. 2023. Milk-Derived Antimicrobial Peptides: Overview, Applications, and Future Perspectives. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 15(1):44–62
- [18] Gaffar A and Suryani E M. 2023. Pemanfaatan Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Bakteriosin Pada Produk Susu. *J. Tampiasih* 1(2):7–14
- [19] Campana R, Van Hemert S and Baffone W. 2017. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathog.* 9(1):1–12
- [20] Lombogia C A, Tulung M, Posangi J and Tallei T E. 2020. Antibacterial Activities of Culture-dependent Bacteria Isolated from *Apis nigrocincta* Gut. *Open Microbiol. J.* 14(1) :72–76
- [21] Hu Q, Fang Y, Zhu J, Xu W and Zhu K. 2021. Characterization of *Bacillus* species from market foods in Beijing, China. *Processes* 9(5) :1–12
- [22] Rusli N S, Lani M N, Shahabudin S, Azmi N S, Taghavi E, Abdullah W Z W, Mahmood A, Bahri A A, Migeemanathan S and Desa M N M. 2023. Antibiotic Susceptibility and Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria from Malaysian Fermented Foods Against Biofilm-Forming *Escherichia coli* Strains. *J. Adv. Res. Appl. Sci. Eng. Technol.* 31(1):168–182
- [23] Zhang W, Lai S, Zhou Z, Yang J, Liu H, Zhong Z, Fu H, Ren Z, Shen L, Cao S, Deng L and Peng G. 2022. Screening and evaluation of lactic acid bacteria with probiotic potential from local Holstein raw milk. *Front. Microbiol.* 13:1–14
- [24] Singhal N, Maurya A K, Mohanty S, Kumar M and Viridi J S. 2019. Evaluation of bile salt hydrolases, cholesterol-lowering capabilities, and probiotic potential of *enterococcus faecium* isolated from rhizosphere. *Front. Microbiol.* 10:1–9
- [25] Li C, Peng K, Xiao S, Long Y and Yu Q. 2023. The role of *Lactobacillus* in inflammatory bowel disease: from actualities to prospects. *Cell Death Discov.* 9(1):1-12
- [26] Komulainen M, Saros L, Vahlberg T, Nermes M, Jartti T and Laitinen K. 2023. Maternal fish oil and/or probiotics intervention: Allergic diseases in children up to two years old. *Pediatr. Allergy Immunol.* 34(8) :1–10
- [27] Litwinek D, Boreczek J, Gambuś H, Buksa K, Berski W and Kowalczyk M. 2022. Developing lactic acid bacteria starter cultures for wholemeal rye flour bread with improved functionality, nutritional value, taste, appearance and safety. *PLoS One* 17(1):1–21
- [28] Zapaśnik A, Sokołowska B and Bryła M. 2022. Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods* 11(9):1–17
- [29] Suryani E M, Jatmiko Y D and Mustafa I. 2023. Detection of Plantaricin-Encoding Gene and Its Partial Purification in *Lactobacillus plantarum* BP102. *J. Biodjati* 8(2):233–247