

**Effect of Probiotic *Enterococcus faecium* IS-27526 and Catfish (*Clarias gariepinus*) oil in Functional Biscuit Enriched with Catfish Flour and Sweet Potato (*Ipomea batatas*) Flour on Fecal Microbiota of Aged Female *Macaca fascicularis***

Erwin Angga Setya Nugraha<sup>1</sup>, Clara M. Kusharto<sup>2</sup>, Ingrid S Surono<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department Community Nutrition, Faculty of Human Ecology, Bogor Agricultural University, Bogor 16680

<sup>2</sup> Department Community Nutrition, Faculty of Human Ecology, Bogor Agricultural University, Bogor 16680

<sup>3</sup> Food Technology Program, Faculty of Engineering, BINUS University, Jakarta 10210

**Abstract**

This study aimed to determine the effect of *probiotic Enterococcus faecium* IS-27526 and catfish (*Clarias gariepinus*) oil in functional biscuit enriched with catfish flour and sweet potato (*Ipomea batatas*) flour on fecal microbiota of aged monkey (*Macaca fascicularis*). There were 9 female aged *Macaca fascicularis* adapted for one month before the study, and divided into 3 groups, namely: control group, *probiotic E. faecium* IS-27526 group, and *probiotic E. faecium* IS-27526 and fish oil group. After 90 days administration, fecal lactic acid bacteria in *probiotic E. faecium* IS-27526 group as well as *probiotic E. faecium* IS-27526 and fish oil group increased significantly ( $p < 0.05$ ) as compared to control group. Fecal coliform bacteria in *probiotic E. faecium* IS-27526 and fish oil group decreased significantly ( $p < 0.05$ ) as compared to control as well as *probiotic E. faecium* groups after 90 days. Taken together, the presence of sweet potato and *probiotic E. faecium* IS-27526 may give synbiotic effect in supporting lactic acid bacteria in the gut of monkey.

**Keywords :** functional biscuits, sweet potato, catfish oil, *probiotic E. faecium* IS-27526, profile fecal microbiota

**PENGARUH *Enterococcus faecium* IS-27526 DALAM PANGAN  
FUNGSIONAL BISKUIT TEPUNG IKAN LELE (*Clarias  
gariiepinus*) TERHADAP VIABILITAS FEKAL MIKROBIOTA MONYET  
EKOR PANJANG (*Macaca fascicularis*) BETINA USIA TUA**

(*Enterococcus faecium* IS-27526 Effect on Functional Food Catfish (*Clarias  
gariiepinus*) Biscuit to Fecal Microbiota Viability of Aged Female *Macaca  
fascicularis*)

Erwin Angga Setya Nugraha<sup>1</sup>, Clara M. Kusharto<sup>2</sup>, Ingrid S Surono<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departemen Gizi Masyarakat, Fakultas Ekologi Manusia, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680  
Email: [anggaerwin77@yahoo.com](mailto:anggaerwin77@yahoo.com)

<sup>2</sup> Departemen Gizi Masyarakat, Fakultas Ekologi Manusia, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680  
Email: [kcl@indo.net.id](mailto:kcl@indo.net.id)

<sup>3</sup> SEAMEO TROPMED Regional Centre for Community Nutrition, Fakultas Kedokteran,  
Universitas Indonesia, Jakarta 10440 Email: [gridsw@yahoo.com](mailto:gridsw@yahoo.com)

### ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of probiotic *E. faecium* and prebiotic in functional food of catfish (*Clarias gariiepinus*) biscuit to fecal microbiota (lactic acid and coliform bacteria) of aged female *Macaca fascicularis*. Experimental design was applied in this study. A total 9 female *Macaca fascicularis* have been conditioned in one month before study begin and were divided into 3 treated groups for 90 days of intervention: A1 catfish biscuit; A2 catfish biscuit + *E. faecium*; A3 catfish biscuit + *E. faecium* + Catfish oil. The study showed that significantly increased in total colony of lactic acid bacteria for three groups on days 30<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup>, and 90<sup>th</sup> continuously. But in 90<sup>th</sup> days, only a group of A3 showed significantly different from the two other groups, in terms of the increase total colony of lactic acid and decrease of total colony coliform bacteria ( $p < 0.05$ )

**Keywords:** functional food, catfish biscuit, *E. faecium*, fecal microbiota.

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian probiotik *E. faecium* dan prebiotik dalam pangan fungsional biskuit ikan lele terhadap viabilitas mikrobiota (bakteri fekal asam laktat dan bakteri fekal koliform) monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) betina usia tua. Penelitian ini merupakan *experimental study* selama 90 hari intervensi. Contoh dalam penelitian ini sebanyak 9 ekor yang telah mengalami masa adaptasi selama satu bulan sebelum perlakuan. Peneliti membagi contoh ke dalam tiga kelompok perlakuan, yaitu: kelompok biskuit ikan lele (A1), kelompok biskuit ikan lele + probiotik *E. faecium* (A2), dan kelompok biskuit ikan lele + probiotik *E. faecium* + minyak ikan lele (A3). Hasil penelitian menunjukkan terdapat peningkatan yang signifikan ( $p < 0.05$ ) jumlah bakteri fekal asam laktat dari ketiga kelompok perlakuan pada titik 30 hari, 60 hari, dan 90 hari. Peningkatan bakteri asam laktat dan penurunan bakteri koliform pada kelompok A3 berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ) dengan kedua kelompok perlakuan lainnya pada titik 90 hari.

**Kata kunci:** pangan fungsional, biskuit ikan lele, *E. faecium*, mikrobiota fekal.

## PENDAHULUAN

### Latar Belakang

Pemerintah Indonesia telah mencanangkan program Indonesia Sehat tahun 2025. Program tersebut mengandung implikasi bahwa Negara Indonesia berkomitmen menjamin hak asasi manusia dengan meningkatkan taraf kesehatan bagi seluruh lapisan masyarakat Indonesia sesuai dengan dasar yang telah ditegaskan dalam UUD 1945. Terdapat beberapa fokus target program tersebut yang diantaranya merupakan kelompok rentan gizi seperti bayi dan balita, ibu hamil, dan lanjut usia (lansia).

Sebesar 20,5 juta (9%) penduduk Indonesia merupakan lansia. Persentase lansia diproyeksikan akan menjadi 11.34 % atau tercatat sekitar 28.8 juta orang pada tahun 2020 yang akan datang (Wirakusumah 2000). Jumlah yang cukup tinggi ini menjadikan lansia sebagai kelompok penduduk rentan gizi yang memerlukan perhatian lebih dalam hal sosial, ekonomi, terutama kesehatan. Perubahan fisiologis dan hormonal menjadikan lansia mudah terserang berbagai penyakit baik penyakit infeksi maupun penyakit degeneratif yang akan berdampak pada status gizi dan kesehatan.

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk membantu meningkatkan status gizi dan status kesehatan adalah dengan pengembangan produk pangan fungsional. Seiring dengan meningkatnya kesadaran masyarakat akan pentingnya konsumsi makanan yang memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan dinilai upaya ini lebih dapat menjangkau akses lansia terhadap gizi dan kesehatan. Pengembangan produk pangan fungsional diharapkan dapat memenuhi kebutuhan energi, zat gizi, dan menguntungkan bagi kesehatan. Salah satu upaya untuk memenuhi kebutuhan tersebut dapat dilakukan dengan konsumsi makanan selingan atau camilan yang tinggi protein dan penambahan bahan prebiotik serta probiotik yang telah teruji memiliki efek positif bagi kesehatan.

Pemilihan bahan tinggi protein, prebiotik dan probiotik ditujukan untuk meningkatkan status gizi lansia, meningkatkan kesehatan saluran pencernaan, dan meningkatkan respon imun hormonal. Dasar pemilihan dalam pengembangan produk biskuit tinggi protein hewani dengan penambahan bahan prebiotik probiotik dilihat dari penerimaan positif konsumen akan biskuit karena praktis dan memiliki daya simpan yang relatif panjang yakni lebih dari 6 bulan dengan pengemasan yang baik. Selain itu, dari segi kesehatan pemilihan biskuit tinggi protein hewani berisi krim probiotik didasarkan pada prinsip probiotik yang dapat bertahan hidup dalam saluran cerna, mampu menempel pada epitel usus, kolonisasi mikroba yang menguntungkan yang masuk ke saluran cerna, mencegah perkembangan bakteri patogen, tahan terhadap asam lambung dan garam empedu sehingga teruji secara klinis menguntungkan bagi kesehatan (Salminen *et al.* 2004).

Salah satu probiotik strain tradisional Indonesia berasal dari fermentasi susu kerbau. Dalam proses fermentasi terkandung bakteri asam laktat *Enterococcus faecium*. Probiotik asal dadih *E.faecium* IS-27526 telah teruji mampu meningkatkan bakteri asam laktat dan menurunkan jumlah total mikroba aerob serta anaerob pada feses lansia (Surono 2004; Rieuwpassa 2004). *E.faecium* IS-27526 memiliki kemampuan bertahan terhadap kondisi asam lambung dan garam empedu, menempel pada epitel usus, meningkatkan perkembangan bakteri

menguntungkan dan menurunkan perkembangan bakteri koliform atau bakteri patogen.

Pengujian sebuah produk baru yang akan diintervensikan kepada manusia harus dilakukan pada hewan percobaan terlebih dahulu. Hal ini dilakukan untuk menguji keamanan ataupun efek samping dari suatu bahan kimia atau alami sebelum diujikan kepada manusia. Hewan percobaan harus memiliki kriteria untuk dijadikan subyek penelitian, antara lain kemiripan fungsi fisiologis dan perubahan biokimia dengan manusia. Monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) memiliki hubungan kekerabatan dengan manusia yang memiliki sistem saluran pencernaan baik mekanis dan enzimatis yang mirip dengan manusia sehingga segala sesuatu dimakan oleh manusia dapat dimakan dan dicerna oleh monyet ekor panjang. Oleh karena itu dilakukan penelitian efek probiotik *E. faecium* IS-27526 dan prebiotik dalam pangan fungsional biskuit ikan lele terhadap viabilitas fekal mikrobiota monyet ekor panjang usia tua.

#### Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian ini adalah mengetahui pengaruh dari probiotik *E. faecium* dalam pangan fungsional biskuit tepung ikan lele terhadap viabilitas mikrobiota (bakteri fekal asam laktat dan bakteri fekal koliform) monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) betina usia tua. Tujuan khusus dari penelitian ini, antara lain: 1) Mempelajari teknik kultivasi biomasa bakteri probiotik *E. faecium* IS-27526 dan uji viabilitas bakteri laktat yang akan diberikan dalam pakan; 2) Menganalisis pengaruh biskuit ikan lele tinggi protein dengan probiotik terhadap profil bakteri fekal asam laktat monyet. 3) Menganalisis pengaruh pemberian biskuit ikan lele tinggi protein dengan probiotik terhadap profil bakteri fekal koliform monyet.

### METODE

#### Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan dari bulan April – Juli 2013 yang merupakan bagian dari penelitian “Pengaruh Pemberian Biskuit Tinggi Protein Berisi Krim Probiotik Fungsional terhadap Status Kesehatan Monyet (*Macaca fascicularis*)”. Penelitian ini dilakukan di Pusat Konservasi dan Studi Primata untuk pemeliharaan dan pemberian perlakuan. Pembudidayaan Probiotik dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Atmajaya Jakarta. Uji viabilitas probiotik dan Profil Fekal Mikrobiota dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Seafast Center, Institut Pertanian Bogor.

#### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biskuit tinggi protein hewani dari tepung tulang dan badan ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*), probiotik *Enterococcus faecium* IS-27526 dengan viabilitas probiotik adalah  $10^8$  cfu/g, monyet betina species *Macaca fascicularis*. Bahan untuk analisis mikrobiologi, antara lain MRSA, VRBA, PCA, dan buffer fosfat.

Peralatan yang digunakan dalam pemeliharaan dan pemberian perlakuan adalah kandang monyet, tempat makan, dan tempat minum. Peralatan yang diperlukan dalam analisis mikrobiologi, antara lain: autoklaf, inkubator 37<sup>0</sup>c, water bath/inkubator 55<sup>0</sup>c, cawan petri, labu erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung, micropipet, refrigerator, hotplate, vortex, coller box, falcon tube, anaerobic jar, dan laminar flow cabinets.

## Desain dan Metode Penelitian

Desain penelitian ini adalah eksperimental dengan pemberian perlakuan (intervensi) menggunakan hewan percobaan *Macaca fascicularis* yang telah disetujui dan memenuhi prosedur penelitian Komisi Kesejahteraan Hewan Laboratorium PSSP IPB (ACUC). Penelitian ini terdiri dari penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Kegiatan dalam penelitian pendahuluan meliputi kultivasi biomassa bakteri probiotik *E. faecium* IS-27526 dan pengujian viabilitas bakteri asam laktat yang akan diberikan dalam pakan. Kegiatan dalam penelitian utama meliputi pengujian viabilitas bakteri fekal asam laktat dan bakteri fekal koliform monyet ekor panjang betina usia tua.

### Penelitian Pendahuluan

Dalam penelitian pendahuluan dilakukan kultivasi biomassa *E. faecium* dan uji viabilitas bakteri probiotik yang akan diberikan dalam pakan. Kultivasi biomassa dilakukan untuk perbanyak bakteri probiotik dan sebagai stok kultur yang akan dicampurkan dalam pakan. Dalam kegiatan ini digunakan media MRSBroth sebagai media aktivasi bakteri di dalam fermentor selama 22 jam. Selama masa fermentasi dilakukan pengujian viabilitas bakteri asam laktat, bakteri koliform dan total bakteri setiap 3 jam untuk memantau pertumbuhan bakteri. Setelah 22 jam, bakteri dibekukan di dalam *freezer* sebagai stok kultur.

Uji viabilitas bakteri probiotik dilakukan untuk menguji viabilitas probiotik dan memastikan jumlah bakteri probiotik yang akan diberikan pada kisaran  $10^8$  sebelum diberikan kepada kelompok uji. Metode yang digunakan dalam uji viabilitas adalah *Pour plate* yakni menumbuhkan bakteri dalam media kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  agar terbentuk koloni pada cawan petri dan jumlahnya dapat dihitung. Perhitungan koloni dilakukan berdasarkan *Standard Plate Count* dengan jumlah terbaik.

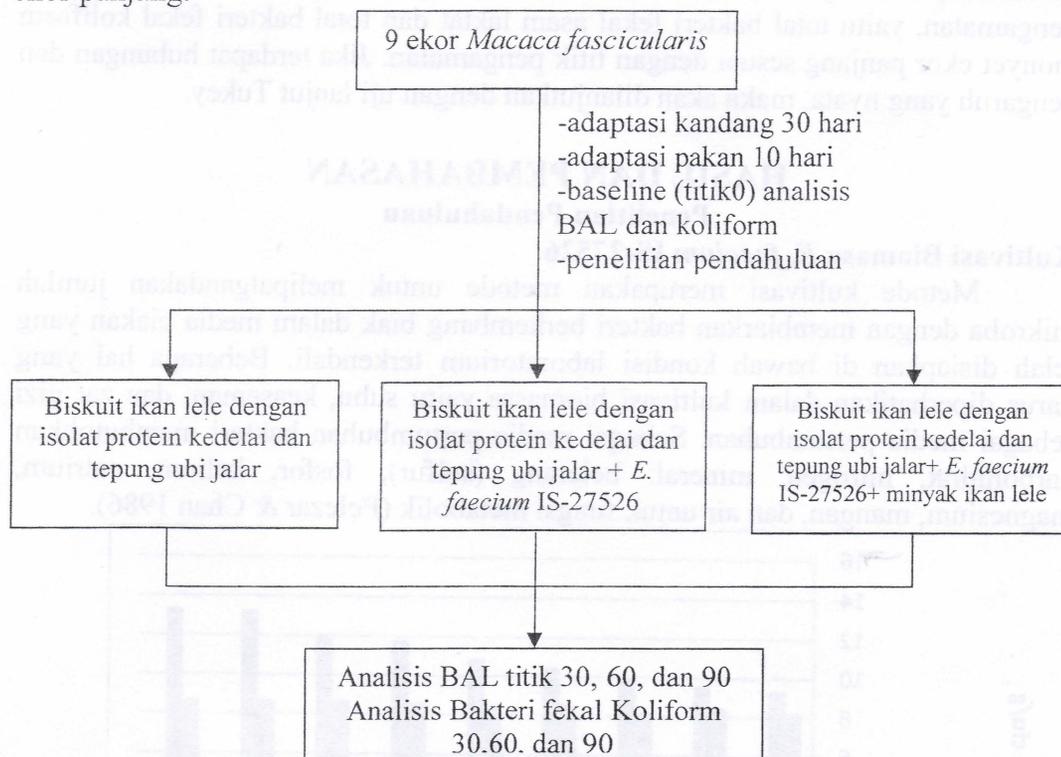
### Penelitian Utama

Dalam penelitian utama dilakukan percobaan pada hewan dengan pemberian biskuit berisi krim probiotik kepada monyet melalui beberapa perlakuan. Masing-masing monyet mendapatkan biskuit sebanyak 100 gram/hari. Dasar pemberian perlakuan tersebut adalah pertimbangan sumbangan energy dari zat gizi dari biskuit ikan lele berisi probiotik yang akan ditujukan kepada lansia, yakni sebesar 10-25% kebutuhan energi sehari. Penelitian ini menggunakan hewan percobaan sebanyak 9 ekor monyet betina species *Macaca fascicularis* dengan syarat sehat, tidak memiliki gangguan pencernaan dan nafsu makan, berusia 3,5-5 tahun (usia tua). Monyet ditempatkan pada kandang per individu dan telah diadaptasikan dengan lingkungan tersebut selama satu bulan. Setiap monyet diadaptasikan dengan 50 gram atau setengah porsi pakan kontrol selama 10 hari sebelum titik 0 penelitian. Contoh dikelompokkan secara acak ke dalam tiga kelompok sebagai berikut:

Tabel 1 Pengelompokan contoh berdasarkan perlakuan

Kelompok	Perlakuan
A1	Biskuit ikan lele dengan isolat protein kedelai dan tepung ubi jalar
A2	Biskuit ikan lele dengan isolat protein kedelai dan tepung ubi jalar + probiotik <i>E. faecium</i> IS-27526
A3	Biskuit ikan lele dengan isolat protein kedelai dan tepung ubi jalar + probiotik <i>E. faecium</i> IS-27526 + minyak ikan lele

Sebanyak 9 ekor monyet ekor panjang, mendapatkan perlakuan sesuai dengan kelompok perlakuan selama 90 hari. Selama perlakuan berlangsung, data diambil setiap 30 hari sekali, yakni pada titik 0 (baseline), titik 30 hari, titik 60 hari, dan titik 90 hari intervensi. Dimana pengujian profil fekal mikrobiota yang dianalisis adalah bakteri fekal asam laktat fekal dan bakteri fekal koliform monyet ekor panjang.



Gambar 1 Diagram Alir Prosedur Penelitian

Analisis viabilitas fekal mikrobiota monyet ekor panjang dilakukan dengan metode *Pour Plate* yaitu menghitung jumlah koloni bakteri fekal asam laktat dan jumlah koloni bakteri fekal koliform pada masing-masing media kultur di dalam cawan petri. Media kultur bakteri asam laktat adalah MRSA yang diberi indikator BP (*bromocresol purple*) dimana bakteri akan tumbuh dalam media tersebut dan terlihat berwarna putih-kuning setelah diinkubasi pada suhu 37°C, 48 jam. Sementara media kultur bakteri koliform adalah VRBA dengan koloni bakteri berwarna merah-hitam setelah diinkubasi pada suhu 37°C, 48 jam.

### Rancangan Percobaan dan Analisis Data

#### Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap faktorial (RAF) dengan faktor pengacakan kelompok dan lama waktu intervensi. Model matematis dari rancangan percobaan tersebut adalah sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + C_{ijk}$$

Keterangan:

$Y_{ijk}$  : Pengamatan Faktor A taraf ke-i, Faktor B taraf ke-j dan Ulangan ke-k

$\mu$  : Rataan Umum

$A_i$  : Pengaruh Faktor A pada taraf ke-i

$B_j$  : Pengaruh Faktor B pada taraf ke-j

$AB_{ij}$  : Interaksi antara Faktor A dengan Faktor B

### Analisis Data

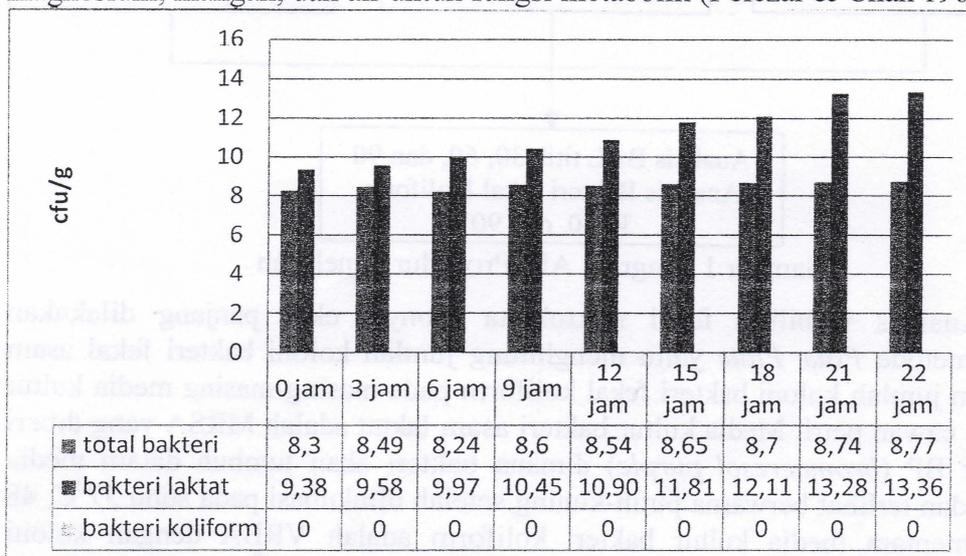
Analisis mikrobiologi krim ditabulasi dan disajikan secara deskriptif, pengaruh perlakuan terhadap bakteri fekal asam laktat dan bakteri fekal koliform monyet ekor panjang dianalisis dengan uji statistik menggunakan *Analysis of Variance (ANOVA)*. Analisis statistik dilakukan pada masing-masing parameter pengamatan, yaitu total bakteri fekal asam laktat dan total bakteri fekal koliform monyet ekor panjang sesuai dengan titik pengamatan. Jika terdapat hubungan dan pengaruh yang nyata, maka akan dilanjutkan dengan uji lanjut Tukey.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penelitian Pendahuluan

#### Kultivasi Biomasa *E. faecium* IS-27526

Metode kultivasi merupakan metode untuk melipatgandakan jumlah mikroba dengan membiarkan bakteri berkembang biak dalam media biakan yang telah disiapkan di bawah kondisi laboratorium terkendali. Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam kultivasi biomassa yaitu suhu, keasaman, dan zat gizi sebagai media pertumbuhan. Sebagai media pertumbuhan bakteri membutuhkan karbohidrat, nitrogen, mineral: belerang (sulfur), fosfor, kalium, natrium, magnesium, mangan, dan air untuk fungsi metabolik (Pelczar & Chan 1986).



Gambar 2 Diagram Batang Hasil Kultivasi Biomassa *S. faecium*

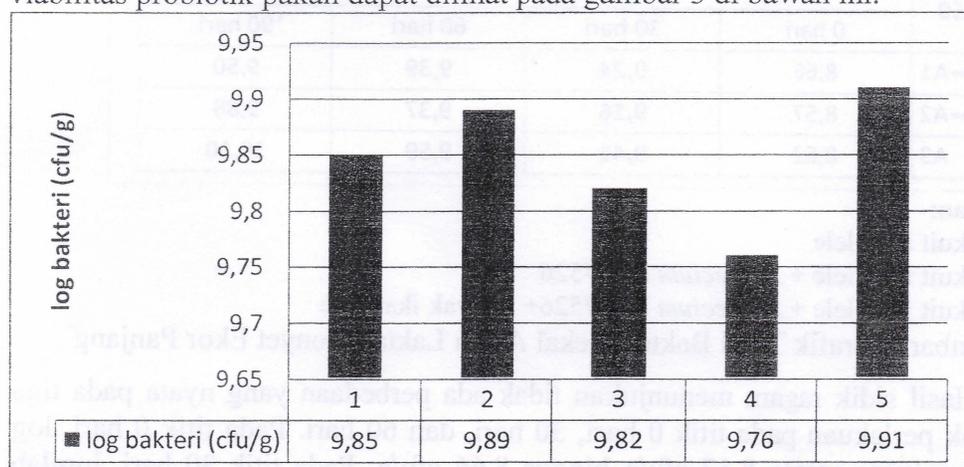
Dalam penelitian ini bakteri dikembangbiakan dalam fermentor selama 22 jam di dalam media MRS Broth. Setiap 3 jam, bakteri di *plating* untuk mengetahui jumlah bakteri yang tumbuh. *Plating* mikroba dilakukan terhadap bakteri asam laktat, bakteri koliform, dan total bakteri.

Hasil *plating* menunjukkan terdapat peningkatan koloni bakteri asam laktat yakni 9.38 cfu/g pada titik 0 hingga 13.36 cfu/g pada titik 22 jam. Peningkatan juga terjadi pada total bakteri dalam media PCA yakni 8.3 cfu/g pada titik 0 hingga 8.77 cfu/g pada titik 22 jam. Total bakteri lebih sedikit daripada jumlah bakteri asam laktat yang diduga karena bakteri asam laktat tidak dapat tumbuh dengan baik pada media PCA. Bakteri asam laktat memerlukan media selektif dalam pertumbuhannya yakni pada media yang mengandung zat gizi kompleks seperti asam amino, purin, pirimidin, dan beberapa vitamin seperti

thiamin, piridoksin, kobalamin, dan biotin. Dari hasil *plating*, juga dapat dilihat tidak terdapat pertumbuhan bakteri koliform yang diduga karena tidak adanya kontaminan karena prosedur dilakukan secara aseptik (tidak memberi kesempatan untuk terjadinya kontaminasi) yakni dengan cara bekerja di dalam ruang steril (*laminare*), pembukaan media kultur seminimum mungkin, serta selalu memperhatikan tingkat sterilisasi dan hygiene personal.

#### Uji Viabilitas Probiotik Pakan

Uji viabilitas probiotik pakan dilakukan untuk menguji viabilitas probiotik dan memastikan jumlah bakteri probiotik yang akan diberikan pada pakan berkisar  $10^8$  sebelum diintervensikan kepada kelompok uji. Data viabilitas diambil sebanyak 5 kali dimulai pada tanggal 13 Mei 2013 hingga 15 Juli 2013. Data viabilitas probiotik pakan dapat dilihat pada gambar 3 di bawah ini.



Keterangan:

1 = 13 Mei 2013

2 = 30 Mei 2013

3 = 10 Juni 2013

4 = 1 Juli 2013

5 = 15 Juli 2013

Gambar 3 Diagram Batang Viabilitas Kultur *E. faecium*

Total bakteri asam laktat probiotik pakan diperoleh dari perhitungan bakteri yang ditumbuhkan pada media MRSA. Berdasarkan uji yang telah dilakukan, viabilitas probiotik pakan berada pada kisaran 9.76 cfu/g – 9.91 cfu/g. Menurut Tannock (1997), salah satu syarat probiotik dalam pakan berkisar antara  $10^6$  –  $10^8$  cfu/g. Oleh karena itu, untuk memenuhi persyaratan tersebut, probiotik yang diberikan ke dalam pakan sebesar  $\pm 1/10$  dari jumlah yang akan diberikan yakni sebesar 0.1 ml.

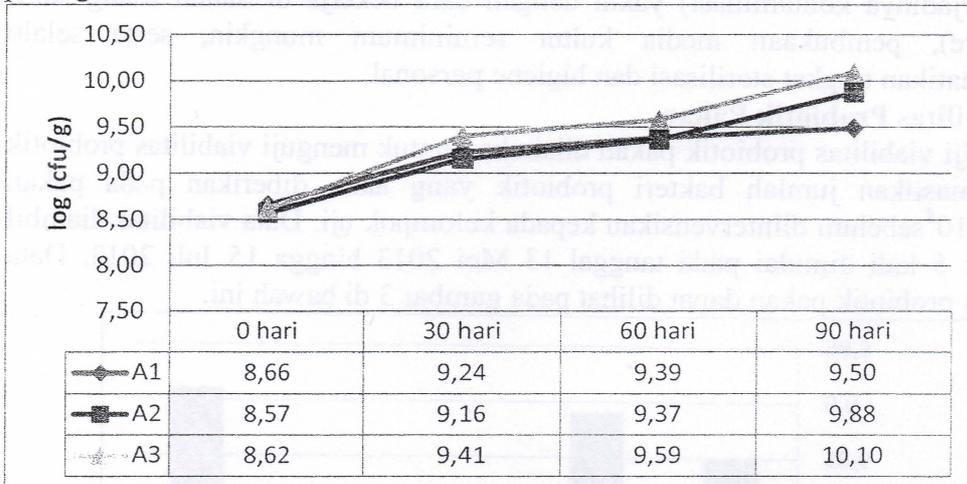
#### Penelitian Utama

##### Total Bakteri Fekal Asam Laktat Monyet Ekor Panjang

Bakteri asam laktat memiliki peranan yang penting bagi kesehatan termasuk kesehatan saluran pencernaan yang telah teruji secara klinis. Bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif, tidak membentuk sitokrom, aerotoleran, anaerobik, hingga mikroaerofilik, membutuhkan nutrisi kompleks seperti asam amino dan vitamin, dan memproduksi asam laktat sebagai produk akhir metabolismenya selama proses fermentasi (Suroño 2004)

Rata-rata jumlah bakteri fekal asam laktat meningkat dari awal penelitian hingga akhir proses intervensi. Pada awal penelitian log bakteri fekal asam laktat

sebesar 8.57 cfu/g – 8.66 cfu/g dan meningkat hingga 9.50 cfu/g - 10.10 cfu/g di akhir penelitian. Secara keseluruhan total bakteri fekal asam laktat dapat dilihat pada gambar 4 di bawah ini.



Keterangan:

A1 = Biskuit ikan lele

A2 = Biskuit ikan lele + *E. faecium* IS-27526

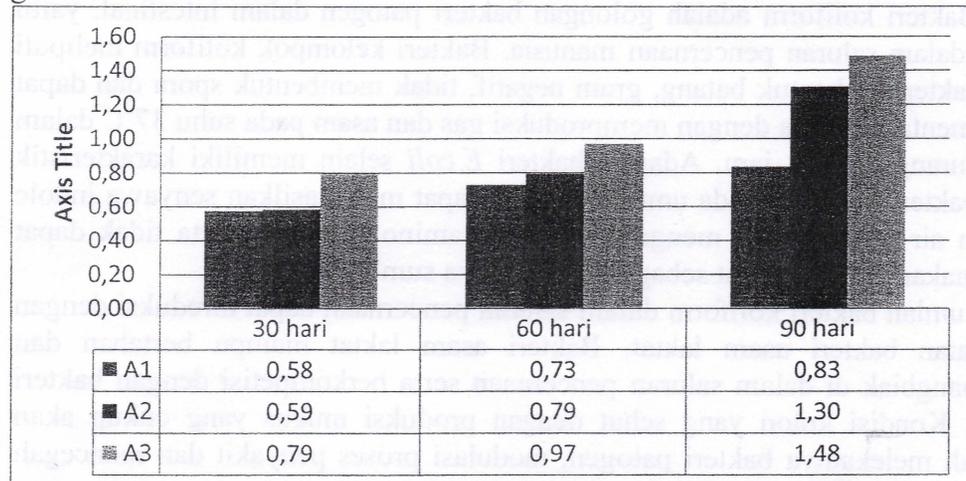
A3 = Biskuit ikan lele + *E. faecium* IS-27526+ minyak ikan lele

Gambar 4 Grafik Total Bakteri Fekal Asam Laktat Monyet Ekor Panjang

Hasil sidik ragam menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada tiga kelompok perlakuan pada titik 0 hari, 30 hari, dan 60 hari. Pada titik 0 hari, log bakteri berikisar antara 8.57 cfu/g hingga 8.66 cfu/g. Pada titik 30 hari, jumlah bakteri fekal asam laktat meningkat pada tiga kelompok perlakuan, masing-masing 9.24 cfu/g untuk kelompok biskuit ikan lele (A1), 9.16 cfu/g untuk kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* (A2), dan 9.41 cfu/g untuk kelompok perlakuan biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3). Pada titik 60 hari, jumlah log bakteri asam laktat kembali meningkat pada ketiga kelompok perlakuan yakni 9.39 cfu/g untuk kelompok biskuit ikan lele (A1), 9.37 cfu/g untuk kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* (A2), dan 9.59 cfu/g untuk kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3). Peningkatan yang terjadi pada titik 30 hari dan 60 hari diduga oleh efek prebiotik dan probiotik dari pakan yang mulai bekerja dalam meningkatkan bakteri asam laktat. Bahan pakan yang memberikan efek prebiotik adalah isolat protein kedelai dan tepung ubi jalar yang terkandung dalam biskuit ikan lele (Rini 2009) sementara probiotik berasal dari bakteri *E. faecium* IS-27526.

Hasil sidik ragam menunjukkan perbedaan yang nyata jumlah bakteri fekal asam laktat pada kelompok perlakuan pada titik 90 hari ( $P < 0.05$ ). Dari hasil uji lanjut Tukey menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3) (10.10 cfu/g) dengan kelompok biskuit ikan lele (A1) (9.50 cfu/g). Namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3) dengan kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* (A2) berdasarkan hasil uji lanjut Tukey. Perlakuan yang paling baik dalam meningkatkan jumlah bakteri asam laktat hingga titik 90 hari adalah kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3). Penambahan minyak ikan lele memberikan profil gizi yang baik. Menurut Lu dan Walker (2001) terdapat beberapa cara untuk meningkatkan

populasi bakteri non patogen dalam saluran pencernaan yakni dengan pemberian gizi yang baik dan lingkungan yang stabil. Bakteri memerlukan gizi dalam proses pertumbuhan dan perkembangbiakannya. Gizi yang digunakan berupa mucin dan metabolit hasil pemecahan zat gizi makro seperti karbohidrat, protein, dan lemak (Bourlioux *et al* 2003). Dengan demikian penambahan minyak ikan diduga memiliki pengaruh dalam memberikan energi, gizi yang baik bagi bakteri asam laktat melalui proses metabolit lemak. Data yang lebih jelas mengenai peningkatan Bakteri Fekal Asam Laktat Monyet Ekor Panjang dapat dilihat pada gambar 5 di bawah ini.



Keterangan:

A1 = Biskuit ikan lele

A2 = Biskuit ikan lele + *E. faecium* IS-27526

A3 = Biskuit ikan lele + *E. faecium* IS-27526+ minyak ikan lele

Gambar 5 Peningkatan Total Bakteri Fekal Asam Laktat Monyet Ekor Panjang

Peningkatan bakteri fekal asam laktat dihitung dengan cara mengurangkan log bakteri titik 30 hari, 60 hari, dan 90 hari dengan log bakteri titik 0 hari. Berdasarkan perhitungan peningkatan jumlah bakteri fekal asam laktat terkecil adalah kelompok perlakuan biskuit ikan lele (A1), yaitu sebesar 0.58 cfu/g, 0.73 cfu/g, dan 0.83 pada intervensi 30 hari, 60 hari, dan 90 hari. Peningkatan jumlah bakteri fekal asam laktat terbesar adalah kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3), yaitu sebesar 0.79 cfu/g, 0.97 cfu/g, dan 0.83 pada intervensi 30 hari, 60 hari, dan 90 hari.

Hasil uji sidik ragam menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan dalam peningkatan bakteri fekal asam laktat monyet ekor panjang pada titik 30 hari dan 60 hari. Hasil uji sidik ragam titik 90 hari menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0.05$ ). Setelah dilakukan uji lanjut Tukey, kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3) berbeda signifikan dengan kelompok biskuit ikan lele (A1). Perbedaan yang signifikan juga terjadi pada kelompok perlakuan biskuit ikan lele + *E. faecium* (A2) dengan kelompok perlakuan biskuit ikan lele (A1). Namun, tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* (A2) dengan kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3).

Peningkatan yang terjadi pada kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* (A2) dan kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3) terhadap perlakuan dan waktu pengamatan diduga disebabkan oleh adanya efek

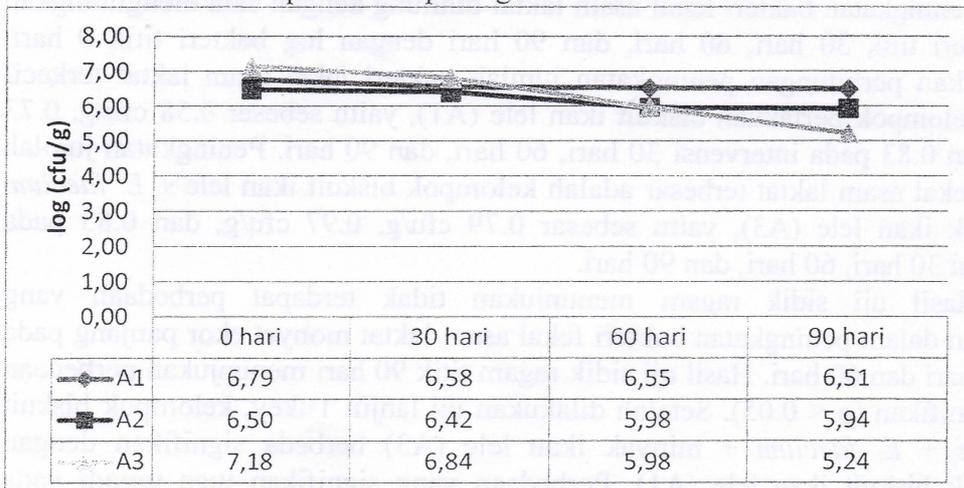
sinbiotik. Sinbiotik memiliki keunggulan dalam meningkatkan daya tahan hidup bakteri probiotik sebagai akibat dari substrat yang spesifik telah tersedia untuk proses fermentasi yang dilakukan oleh bakteri (Rini 2011). Dengan demikian pemberian perlakuan biskuit ikan lele + *E. faecium* (A2) dan perlakuan biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3) lebih efektif dalam meningkatkan bakteri fekal asam laktat monyet ekor panjang daripada kelompok biskuit ikan lele saja (A1).

### Total Bakteri Fekal Koliform Monyet Ekor Panjang

Bakteri koliform adalah golongan bakteri patogen dalam intestinal, yaitu hidup didalam saluran pencernaan manusia. Bakteri kelompok koliform meliputi semua bakteri berbentuk batang, gram negatif, tidak membentuk spora dan dapat memfermentasi laktosa dengan memproduksi gas dan asam pada suhu 37°C dalam waktu kurang dari 48 jam. Adapun bakteri *E. coli* selain memiliki karakteristik seperti bakteri koliform pada umumnya juga dapat menghasilkan senyawa indole di dalam air pepton yang mengandung asam amino triptofan, serta tidak dapat menggunakan natrium sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon.

Jumlah bakteri koliform dalam saluran pencernaan dapat direduksi dengan peningkatan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat mampu bertahan dan berkembangbiak di dalam saluran pencernaan serta berkompetisi dengan bakteri patogen. Kondisi kolon yang sehat dengan produksi mukus yang cukup akan mencegah melekatnya bakteri patogen, modulasi proses penyakit dan mencegah inflamasi. (Drisko et al 2003).

Total fekal bakteri koliform menurun selama masa intervensi. Rata-rata jumlah bakteri fekal koliform monyet ekor panjang sebelum intervensi berkisar antara 6.79 cfu/g – 7.18 cfu/g, sedangkan pada akhir intervensi mengalami penurunan yang berkisar antara 5.24 cfu/g – 6.51 cfu/g. Secara keseluruhan total bakteri asam laktat dapat dilihat pada gambar 6 di bawah ini.



Keterangan:

A1 = Biskuit ikan lele

A2 = Biskuit ikan lele + *E. faecium* IS-27526

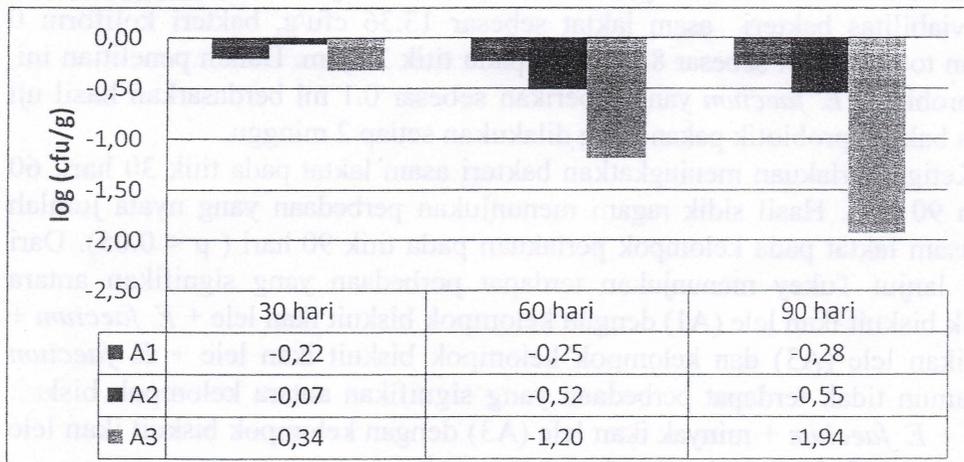
A3 = Biskuit ikan lele + *E. faecium* IS-27526+ minyak ikan lele

Gambar 6 Grafik Total Bakteri Fekal Koliform Monyet Ekor Panjang

Hasil uji Anova menunjukkan bahwa penurunan bakteri fekal koliform tidak berbeda signifikan dari ketiga kelompok perlakuan pada pengamatan titik 0 hari, 30 hari, dan 60 hari ( $p > 0.05$ ). Pada titik 0 hari, log bakteri berkisar antara

6.50 cfu/g hingga 7.18 cfu/g. Pada titik 30 hari, jumlah bakteri koliform menurun pada tiga kelompok perlakuan, masing-masing 6.58 cfu/g untuk kelompok biskuit ikan lele (A1), 6.42 cfu/g untuk kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* (A2), dan 6.84 cfu/g untuk kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3). Pada titik 60 hari, jumlah log bakteri asam laktat kembali menurun pada ketiga kelompok perlakuan yakni 6.55 cfu/g untuk kelompok biskuit ikan lele (A1), 5.98 cfu/g untuk kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* (A2) dan kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3). Penurunan yang terjadi pada titik 30 hari dan 60 hari diduga oleh efek prebiotik dan probiotik dari pakan yang mulai bekerja dalam meningkatkan bakteri asam laktat kemudian bakteri asam laktat berperan dalam mencegah bakteri koliform menempel dalam intestinal serta menghambat pertumbuhannya.

Hasil sidik ragam menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0.05$ ) jumlah bakteri fekal koliform pada kelompok perlakuan di titik 90 hari. Dari hasil uji lanjut Tukey menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3) (5.24 cfu/g) dengan kelompok biskuit ikan lele (A1) (6.51 cfu/g). Namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3) dengan kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* (A2) berdasarkan hasil uji lanjut Tukey. Perlakuan yang paling baik dalam menurunkan bakteri koliform hingga titik 90 hari adalah kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3). Penambahan minyak ikan lele memberikan profil gizi yang baik. Menurut Lu dan Walker (2001) terdapat beberapa cara untuk meningkatkan populasi bakteri non patogen dalam saluran pencernaan yakni dengan pemberian gizi yang baik dan lingkungan yang stabil. Dengan meningkatnya bakteri non-patogen, jumlah bakteri patogen atau koliform akan menurun. Mekanisme antagonistik yang terjadi dilakukan oleh bakteri asam laktat yang memproduksi senyawa antimikroba seperti asam laktat, asetat, propionat, bakteriosin, asam organik dan metabolit sekunder lainnya. Data yang lebih jelas mengenai penurunan bakteri fekal koliform monyet ekor panjang dapat dilihat pada gambar 7 di bawah ini.



Keterangan:

A1 = Biskuit ikan lele

A2 = Biskuit ikan lele + *E. faecium* IS-27526

A3 = Biskuit ikan lele + *E. faecium* IS-27526+ minyak ikan lele

Gambar 7 Penurunan Total Bakteri Fekal Koliform Monyet Ekor Panjang

Penurunan bakteri fekal koliform dihitung dengan cara mengurangkan log bakteri titik 30 hari, 60 hari, dan 90 hari dengan log bakteri titik 0 hari. Berdasarkan perhitungan penurunan bakteri koliform terkecil adalah kelompok biskuit ikan lele (A1), yaitu sebesar 0.22 cfu/g, 0.25 cfu/g, dan 0.28 pada intervensi 30 hari, 60 hari, dan 90 hari. Penurunan bakteri fekal koliform terbesar adalah kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3), yaitu sebesar 0.34 cfu/g, 1.20 cfu/g, dan 1.94 pada intervensi 30 hari, 60 hari, dan 90 hari.

Hasil uji sidik ragam menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan dalam penurunan bakteri fekal koliform monyet ekor panjang pada titik 30 hari dan 60 hari. Hasil uji sidik ragam titik 90 hari menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0.05$ ). Setelah dilakukan uji lanjut Tukey, kelompok perlakuan biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3) berbeda signifikan dengan kelompok biskuit ikan lele (A1) dan kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* (A2).

Penurunan bakteri fekal koliform yang terjadi pada kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3) terhadap kelompok perlakuan dan waktu pengamatan diduga disebabkan oleh peningkatan jumlah bakteri asam laktat pada kelompok perlakuan A3 yang lebih tinggi dari kedua kelompok lainnya, A1 dan A2. Dengan adanya penambahan minyak ikan lele dalam ransum pakan kelompok A3 maka memberikan profil gizi yang baik yang dapat mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat dalam saluran pencernaan. Pertumbuhan bakteri asam laktat akan menurunkan jumlah bakteri patogen atau bakteri koliform melalui mekanisme antagonistik. Mekanisme antagonistik yang terjadi adalah mencegah penempelan bakteri koliform pada mukosa usus yang akan mencegah pertumbuhan bakteri koliform.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Hasil kultivasi biomasa probiotik *E. faecium* diperoleh bakteri probiotik dengan viabilitas bakteri asam laktat sebesar 13.36 cfu/g, bakteri koliform 0 cfu/g, dan total bakteri sebesar 8.77 cfu/g pada titik 22 jam. Dalam penelitian ini, bakteri probiotik *E. faecium* yang diberikan sebesar 0.1 ml berdasarkan hasil uji viabilitas bakteri probiotik pakan yang dilakukan setiap 2 minggu.

Ketiga perlakuan meningkatkan bakteri asam laktat pada titik 30 hari, 60 hari, dan 90 hari. Hasil sidik ragam menunjukkan perbedaan yang nyata jumlah bakteri asam laktat pada kelompok perlakuan pada titik 90 hari ( $p < 0.05$ ). Dari hasil uji lanjut Tukey menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok biskuit ikan lele (A1) dengan kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3) dan kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* (A2). Namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3) dengan kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* (A2) berdasarkan hasil uji lanjut Tukey.

Ketiga kelompok perlakuan menurunkan bakteri koliform pada titik 30 hari, 60 hari, dan 90 hari. Hasil sidik ragam menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0.05$ ) jumlah bakteri koliform pada kelompok perlakuan di titik 90 hari. Dari hasil uji lanjut Tukey menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3) dengan

kelompok biskuit ikan lele (A1) dan kelompok biskuit ikan lele + *E. faecium* (A2). Dengan demikian kelompok perlakuan biskuit ikan lele + *E. faecium* + minyak ikan lele (A3) meningkatkan bakteri fekal asam laktat dan menurunkan bakteri fekal koliform lebih besar daripada kedua kelompok yang lainnya.

#### Saran

Formula terbaik dalam meningkatkan bakteri asam laktat dan menurunkan bakteri koliform adalah kelompok prebiotik + probiotik + minyak ikan lele (A3). Dalam hal ini perlu dikaji lebih lanjut lagi mengenai komponen aktif dalam minyak ikan dan mekanismenya dalam peran meningkatkan bakteri asam laktat dan menurunkan bakteri koliform.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Agostoni C, Axelsson I, Goulet O, Koletzko B, Michaelsen KF, Puntis J, Rieu D, Rigo J, Shamir R, Agostoni H, dan Turck D. 2006. Soy Protein Infant Formulae and Follow-On Formulae: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 42:352-361
- Aldrich-Blake. 1980. Long-tailed macaques. Plenum Press, New York.
- Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S. & A. V. Wright (Eds). *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker, New York.
- Boulioux P, Koletzko B, Guarner F & Braesco V. 2003. The Intestine and Its Microflora are Partners for Protection of The Host: Report on The Danone Symposium "The Intelligent in Intestine", held in Paris, June 14, 2002. *Am. J. Clin. Nutr.* 78:675-683.
- [BPOM] Badan Pengawas Obat dan Makanan 2005. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor Hk 00.05.52.0685 tentang Ketentuan Pokok Pengawasan Pangan Fungsional. Jakarta: BPOM. [www.pom.go.id](http://www.pom.go.id) [25 Mei 2013].
- Collado CM, Surono IS, Meriluoto J & Salminen S. 2007. Indigenous Dadih Lactic Acid Bacteria: Cell-Surface Properties and Interaction with Pathogens. *Journal of Food Science*. 72:3:89-93
- Corsetti A., M. Gobbetti, & E. Smacchi. 1996. Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiol.* 13: 447-456.
- Drisko JA, Giles CK & Bischoff BJ. 2003. Probiotics in Health Maintenance and Disease Prevention. *Alternative Medicine Review*. 8:2
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2001. *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk With Live Lactic Bacteria*. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotic in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.
- Fardiaz S. 1989. Mikrobiologi Pangan. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor.
- Salminen S, Wright AV & Ouvvehand A. 2004. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Revised and Expanded 3rd Edition. New York: Marcel Dekker. Inc

- Helander, I.M., A. von Wright & T.M. Mattila-Sandholm. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobial against Gram negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 8: 146-150.
- Indratingsih W, Salasia SIO & Wahyuni E. 2004. Produksi Yoghurt Shitake (Yoshitake) sebagai Pangan Kesehatan Berbasis Susu. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* XV,1:54-60
- Kimoto H, Kurisaki J, Tsuji MN, Ohmomo S & Okamoto T. 1999. Lactococci as probiotics strain: adhesion to human enterocyte-like caco-2 cells and toleransto low pH and bile. *Lett in Appl. Microbiol.* 29: 313-316
- Lavermicocca P, F. Valeria, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti, & M. Gobetti 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds by sourdough *Lactobacillus plantarum* 21 B. *Appl. Environ Microbiol.* 66:4084- 4090.
- Lisal JS. 2005. Konsep probiotik dan prebiotik untuk modulasi mikrobiota usus besar. *J Med Nus* 26(4): 259-262.
- Lu L & Walker WA. 2001. Phatologic and Phisiologic Interactions of Bacteria with The Gastrointestinal Ephilium. *Am. J. Clin Nutr.* 73: 1124s-1130s.
- Malole MBM & Pramono CSU. 1989. Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
- Marteau, PR., de Vrese M., Cellier CS., Schrezeenmeir J. 2001. Protection From Gastrointestinal Diseases With The Use of Probiotics. *Am J Clin Nutr.* 73: 430-436.
- Messens W & L. De Vugst. 2002. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs- a revue. *Intl. J. Food Microbiol.* 72: 31-43.
- Nakazawa Y & Hosono A. 1992. Function of Fermented Milk: Challenges for the health scientist. *Elsevier Applied Science.*
- Pelczar, J.M. & E.C.S. Chan. 2008. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Jilid 1. Terjemahan. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Rieuwpassa F. 2004. *Biskuit Konsentrat Ikan dan Probiotik Sebagai Makanan Tambahan untuk Meningkatkan Antibodi IgA dan Status Gizi Balita.* [Disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Savadogo, A., Ouattara A.T.C., Bassole H.N.I., & Traore S.A. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. *Afric. J. Biotechnol.* 5 (9): 678-683.
- Surono, Ingrid S. 2003. *In vitro probiotic properties of indigenous dadih lactic acid bacteria.* *Asian-Aus J. Anim Sci.* 16:726-731
- \_\_\_\_\_.2004. *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan.* Jakarta: YAPMMI
- Smid, E.J. & L.G.M. Gorris. 2007. Natural antimicrobials for food preservation. In: Rahman, M.S. (Eds.). *Handbook of Food Preservation.* 2nd Ed. CRC Press, New York.
- Tannock GW. 1997. *Probiotics a Critical Review.* New York: Horizon Scientific Press.
- Vuyst, L.D. & E.J. Vandamme. 1994. Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. In: Vuyst, L.D. & E.J. Vandamme (Eds.). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetic and Application.* Blakie Academic and Profesional, London.
- Wirakusumah, 2000. *Tetap Bugar di Usia Lanjut.* Jakarta. Trubus Agriwidya.