

## Karakter Bakteri Asam Laktat *Enterococcus* sp. yang Diisolasi dari Saluran Pencernaan Ternak

### (*Characteristics of Lactic Acid Bacteria Enterococcus sp. Isolated from the Gastrointestinal Tract of Animal*)

YANTYATI WIDYASTUTI\* & EVA SOFARIANAWATI

*Puslitbang Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jalan Raya Bogor Km 46, Cibinong 16911*

Characteristics of three isolates of Gram-positive and catalase-negative cocci in chains isolated from the faeces and rumen of cow and buffalo were studied. Characterization of the isolates was emphasized mainly on their growth and biochemical characteristics. These isolates showed similar characteristics to the genus *Enterococcus* except that they do not grow at the medium with 6.5 % NaCl. Furthermore, the isolates showed similar characteristics to the members of *E. faecium* species group, although none of them had same characteristics with one species under the group. Detail characteristics of the isolates were described.

Key words: characteristics of lactic acid bacteria, *Enterococcus*, gastrointestinal tract of animal

Secara alami bakteri asam laktat banyak dijumpai di berbagai habitat seperti makanan fermentasi, buah-buahan dan saluran pencernaan manusia atau ternak. Pada saluran pencernaan ternak dilaporkan adanya bakteri asam laktat di rumen (Hungate 1966, Stewart 1992). Sejauh ini diketahui bahwa bakteri asam laktat tidak bersifat patogen dan aman untuk dikonsumsi sehingga dapat dipakai untuk meningkatkan kesehatan baik manusia maupun ternak.

Bakteri asam laktat adalah bakteri yang mampu memfermentasikan gula atau karbohidrat untuk memproduksi asam laktat dalam jumlah besar. Ciri-ciri bakteri asam laktat secara umum adalah selnya bereaksi positif terhadap pewarnaan Gram, bereaksi negatif terhadap katalase dan tidak membentuk spora. Dari fermentasi glukosa akan dihasilkan asam laktat. Tipe fermentasi bakteri asam laktat meliputi homolaktat yaitu yang hasil fermentasinya hanya asam laktat dan heterolaktat yang hasil fermentasinya di samping asam laktat ada asam organik lainnya seperti asetat, gas CO<sub>2</sub>, dan etanol. Beberapa marga bakteri asam laktat adalah *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, dan *Lactococcus*.

Asam laktat yang dihasilkan bakteri asam laktat dalam saluran pencernaan dapat mencegah pertumbuhan bakteri yang merugikan dan sebagai kontrol pembuangan kotoran dengan cara merangsang dinding saluran pencernaan. Asam-asam organik seperti asam laktat dan asam asetat yang diproduksi bakteri asam laktat sebagai hasil fermentasi laktosa dalam susu dapat membantu aktivitas usus dengan merangsang peristaltis, meningkatkan pencernaan dan penyerapan. Di lain pihak asam organik yang diproduksi bakteri asam laktat dapat menambah cita

rasa dan aroma pada makanan dan pada waktu yang sama pertumbuhan bakteri yang merugikan dapat dicegah. Bakteri asam laktat juga dilaporkan bermanfaat untuk merangsang sistem kekebalan dan resistensi terhadap infeksi dan kanker (Mitsuoka 1989).

Berdasarkan karakter bakteri asam laktat yang bermanfaat untuk kesehatan baik manusia maupun ternak, perlu diketahui jenis bakteri asam laktat dari saluran pencernaan untuk aplikasi yang menguntungkan seperti pembuatan probiotik. Probiotik 'Cellobacterin' yang mengandung campuran bakteri rumen selulolitik dan bakteri asam laktat telah diketahui bermanfaat untuk meningkatkan pencernaan serat kasar sebesar 3% pada anak sapi (Kaldmae & Vadl 1991). Untuk mendapatkan manfaat yang optimum dari probiotik harus dipakai strain bakteri asam laktat yang berasal dari habitat yang sama, yaitu saluran pencernaan (Havenaar *et al.* 1992). Berdasarkan kepentingan tersebut perlu diisolasi dan dipelajari karakteristik jenis-jenis bakteri asam laktat dari saluran pencernaan ternak. Hal ini juga diperlukan untuk mengetahui keanekaragaman bakteri asam laktat ternak yang berasal dari daerah tropis yang kondisinya berbeda dengan negara-negara lain, khususnya Indonesia. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk memberikan gambaran karakter bakteri asam laktat dan menambah informasi keanekaragaman bakteri asam laktat saluran pencernaan sapi dan kerbau.

#### BAHAN DAN METODE

**Isolasi Bakteri Asam Laktat dan Media Pertumbuhan.** Sampel untuk isolasi berasal dari cairan rumen dan kotoran sapi, kerbau, domba, dan kambing. Semua sampel diperoleh dalam keadaan segar. Cairan

\* Penulis untuk korespondensi, Tel. 62-21-8754625,  
Faks. 62-21-8754588, E-mail: ywidyastuti@hotmail.com

rumen diperoleh dari ternak yang mempunyai fistula dan dari rumah potong hewan (RPH). Sampel kotoran diambil dari bagian dalam untuk menghindari pengaruh udara. Ternak berasal dari Bogor dan Nusa Tenggara Timur (NTT). Media untuk isolasi yang digunakan adalah agar-agar MRS dengan komposisi (%) pepton, 1; *lab lemco powder*, 0.8; ekstrak ragi, 0.4; glukosa, 2; tween 80, 0.1;  $K_2HPO_4$ , 0.2; Na-asetat  $3H_2O$ , 0.5;  $(NH_4)_2H$ -sitrat, 0.2;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.02;  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , 0.005; agar, 1.2 dan ditambahkan  $CaCO_3$ , 0.5. Larutan pengencer yang digunakan adalah 0.85 % NaCl. Satu ml sampel yang ditumbuhkan pada media agar-agar MRS diambil dari pengenceran  $10^{-6}$  hingga  $10^{-8}$ . Inkubasi dilakukan selama 2-3 hari pada suhu  $38^\circ C$  secara anaerob dengan metode *roll tube* (Hungate 1969).

#### Pengamatan Morfologi Sel dan Reaksi Pewarnaan.

Untuk pengamatan morfologi sel dan reaksi pewarnaan Gram isolat bakteri asam laktat ditumbuhkan pada MRS cair yang diinkubasi selama kurang lebih 18 jam pada suhu  $38^\circ C$ . Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop pada pembesaran 1000 kali.

**Pengamatan Reaksi Katalase.** Isolat bakteri asam laktat yang telah tumbuh pada 4 ml MRS cair disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Pada sel yang telah terkumpul ditambahkan larutan  $H_2O_2$  3% sebanyak 1 ml. Reaksi katalase positif ditunjukkan oleh adanya busa atau buih yang terjadi setelah penambahan larutan tersebut selama 1 menit. Apabila tidak terjadi busa atau buih pengamatan dilanjutkan dengan penambahan larutan  $NaN_3$  3% sebanyak 1 ml.

**Pengamatan Tipe Fermentasi.** Produksi asam laktat (L) dihitung dengan cara titrimetri menggunakan larutan NaOH dengan konsentrasi 0.1 N. Produksi etanol (E) dihitung dengan menggunakan 'kit' untuk etanol (Boehringer & Mannheim GmbH 176290). Perbandingan produksi etanol dan asam laktat (E/L) dipakai untuk menentukan tipe fermentasi, dimana untuk homolaktat adalah  $0 \leq E/L \leq 0.05$  dan untuk heterolaktat adalah  $0.30 \leq E/L \leq 0.51$  (Kozaki *et al.* 1992). Produksi gas diamati dengan menggunakan tabung Durham pada isolat yang ditumbuhkan pada 5 ml MRS cair. Inkubasi dilakukan selama 48 jam pada suhu  $38^\circ C$ . Adanya gas yang diproduksi dapat dipakai untuk menentukan tipe fermentasi heterolaktat.

**Pengamatan Produksi  $NH_3$  dari Arginin.** Isolat bakteri asam laktat ditumbuhkan pada media GYP dengan komposisi (%) glukosa, 1; pepton, 0.5; ekstrak ragi, 0.5; tween 80, 1; dan arginin, 0.3. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu  $38^\circ C$ . Satu ml isolat bakteri asam laktat ditambahkan dengan 1 ml larutan Nessler (larutan I: 100 g  $Hg I_2$  dan 70 g KI dilarutkan dalam air suling, larutan II: 160 g NaOH dilarutkan dalam 500 ml air suling. Kemudian larutan I dan II dicampurkan dan ditambah air suling sampai menjadi 1 liter) dan diamati warna yang terjadi.

**Pengamatan Pertumbuhan.** Pengamatan pertumbuhan dilakukan atas berbagai perlakuan yang diujikan meliputi pertumbuhan pada GYP cair pada berbagai suhu yaitu  $10^\circ C$ ,

$15^\circ C$ ,  $45^\circ C$  dan  $60^\circ C$  selama 30 menit, berbagai konsentrasi NaCl yaitu 4% dan 6.5%, media dengan pH 9.6 dan kebutuhannya terhadap oksigen. Media dengan pH 9.6 disterilisasi dengan menggunakan filter yang ukuran porinya  $0.22 \mu m$ . Pertumbuhan diamati berdasarkan nilai absorbansi yang diukur menggunakan Spectronic 21D pada panjang gelombang 660 nm. Kebutuhan isolat terhadap oksigen diujikan dengan cara menumbuhkan isolat pada kondisi aerob pada cawan petri.

**Uji Biokimia.** Uji biokimia dilakukan dengan menggunakan 'kit' API 50 CHL (API Bio Merieux, Perancis). Media API 50 CHL merupakan media siap pakai yang mengandung 49 macam karbohidrat. Pengamatan atas uji biokimia dilakukan berdasarkan kemampuan isolat bakteri asam laktat untuk memfermentasikan atau bereaksi dengan karbohidrat yang diujikan. Sel isolat bakteri asam laktat diperoleh melalui sentrifugasi kemudian dibuat suspensinya pada media suspensi. Masing-masing karbohidrat pada API 50 CHL diinokulasikan dengan suspensi isolat bakteri yang diuji. Inkubasi dilakukan selama 48 jam pada suhu  $38^\circ C$ . Perubahan warna yang terjadi dinilai berdasarkan persentase pembentukan warna kuning (reaksi positif).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri asam laktat pada media MRS yang mengandung 0.5 %  $CaCO_3$  sangat mudah karena ditandai dengan adanya zona terang di sekeliling koloninya. Adanya zona terang merupakan akibat diproduksinya asam yang menetralkan  $CaCO_3$  yang terdapat pada media selama pertumbuhan bakteri asam laktat tersebut. Dari hasil isolasi diperoleh 13 isolat dari rumen, masing-masing rumen kerbau (6 isolat), rumen sapi (5 isolat) dan rumen domba (2 isolat) serta 18 isolat diperoleh dari kotoran, masing-masing kotoran sapi (14 isolat), kotoran domba (1 isolat) dan kotoran kambing (3 isolat). Bakteri asam laktat yang diisolasi dari rumen jumlahnya lebih sedikit dibanding dari kotoran, hal ini mungkin disebabkan karena lingkungan rumen yang anaerob lebih membatasi kehidupan bakteri asam laktat, walaupun bakteri asam laktat bersifat fakultatif anaerob.

Sebanyak 3 isolat masing-masing berasal dari kotoran sapi yaitu isolat TSD-6 dan rumen kerbau yaitu isolat RKD-2 dan RKNTT-1 yang bentuk selnya bulat dan membentuk rantai serta tidak mempunyai spora dipilih untuk dipelajari karakteristiknya. Semua isolat bersifat Gram positif dan tidak menghasilkan katalase tetapi memproduksi amoniak dari arginin. Pengujian pertumbuhan pada suasana anaerob dan aerob menunjukkan bahwa semua isolat tumbuh subur pada kedua kondisi tersebut. Dengan demikian isolat-isolat tersebut adalah kelompok bakteri fakultatif anaerob. Perbandingan E/L masing-masing isolat adalah 0.00088; 0.0235 dan 0.0039 untuk isolat TSD-6, RKD-1 dan RKNTT-1. Semua nilai tersebut lebih kecil dari 0.05 sehingga semua isolat tersebut

termasuk homofermentatif (Kozaki *et al.* 1992). Semua karakter di atas sesuai dengan sebagian karakter fenotipe dari marga *Enterococcus* (Devriese & Pot 1995). Selanjutnya dari uji pertumbuhannya pada berbagai suhu menunjukkan bahwa semua isolat tumbuh pada suhu 10°C, 15°C dan 45°C. Hanya isolat TSD-6 yang tumbuh pada suhu 60°C selama 30 menit. Semua isolat tumbuh pada media dengan pH 9.6 dan media yang mengandung 4% NaCl, tetapi tidak pada media yang mengandung 6.5% NaCl. Berdasarkan keempat karakteristik pertumbuhan tersebut, kecuali tidak tumbuh pada media yang mengandung 6.5 % NaCl, ketiga isolat tersebut termasuk dalam marga *Enterococcus* (Devriese & Pot 1995). Dari marga *Enterococcus* ada 3 jenis, yaitu *E. cecorum*, *E. columbae*, dan *E. avium* yang seringkali tidak tumbuh pada media yang mengandung 6.5% NaCl.

Kemampuan untuk memproduksi asam pada beberapa karbohidrat merupakan karakter yang dapat dipakai untuk konfirmasi atau kesesuaian isolat TSD-6, RKD-1 dan RKNTT-1 terhadap marga *Enterococcus* (Tabel 1).

Tabel 1. Kesesuaian isolat TSD-6, RKD-1 dan RKNTT-1 pada genus *Enterococcus*

Karakter Produksi asam dari:	<i>Enterococcus</i>	Isolat TSD-6	Isolat RKD-1	Isolat RKNTT-1
<i>N</i> -asetyl glucosamin	+	+	+	+
Amigdalinal	+	-	-	-
D-Arabinosa	-	-	-	-
Arbutin	+	+	-	+
Selobiosa	+	+	+	+
Erithritol	-	-	-	-
D-Fruktosa	+	+	+	+
Galaktosa	+	+	+	+
$\beta$ -Gentibiosa	+	+	+	+
Glukosa	+	+	+	+
Glikogen	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
D-Fukosa	-	-	-	-
L-Fukosa	-	-	+	+
Laktosa	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+
D-Manosa	+	+	+	+
$\alpha$ -Metil D-xilosida	-	-	-	-
Ribosa	+	+	+	+
Salisin	+	+	+	+
Trehalosa	+	+	+	+
L-xilosa	-	-	-	-

Secara umum banyak kesesuaian antara ketiga isolat tersebut dengan marga *Enterococcus*, kecuali fermentasi amigdalinal yang negatif pada semua isolat, fermentasi arbutin yang negatif pada isolat RKD-1 dan fermentasi L-fukosa yang positif pada isolat RKD-1 dan RKNTT-1. Fermentasi atau produksi asam dari karbohidrat tertentu seperti ribosa dari semua isolat sesuai untuk marga *Enterococcus*. Karakter ini sangat menentukan, karena hampir seluruh jenis pada marga *Enterococcus* bereaksi positif terhadap ribosa, kecuali *E. flavescens*. Selain itu dari fermentasi glikogen semua isolat termasuk marga

*Enterococcus*. Sedangkan dari fermentasi L-arabinosa hanya 2 isolat yang memproduksi asam, kecuali isolat TSD-6 (Devriese & Pot 1995).

Selanjutnya berdasarkan kemampuan dalam memfermentasikan karbohidrat untuk jenis-jenis dalam marga *Enterococcus*, ketiga isolat tersebut diduga termasuk dalam kelompok *E. faecium*. Kelompok ini terdiri dari *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* dan *E. mundtii* (Devriese & Pot 1995, Hardie & Whiley 1997). Kesesuaian dengan kelompok *E. faecium* dari fermentasi karbohidrat terlihat dari tidak diproduksinya asam dari 5-ketoglukonat dan D-turanosa. Di samping itu juga sesuai untuk hasil fermentasi yang variabel dari pati,  $\alpha$ -metil-D-manosida, rhamnosa, sukrosa dan D-tagatosa. Karakter ketiga isolat tersebut menunjukkan adanya kesesuaian dengan karakter anggota kelompok *E. faecium* (Tabel 2) walaupun belum sesuai benar dengan salah satu jenis dalam kelompok *E. faecium*.

Tabel 2. Kesesuaian isolat TSD-6, RKD-1 dan RKNTT-1 pada kelompok *Enterococcus faecium*

Karakter Produksi asam dari:	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus mundtii</i>	Isolat TSD-6	Isolat RKD-1	Isolat RKNTT-1
L-Arabinosa	+	-	-	+	+	+	+
Glukonat	v	-	-	-	td	td	td
Manitol	v+	-	-	+	-	-	+/-
Melibiosa	v+	-	-	+	-	-	+
$\alpha$ -metil-D-manosida	v-	-	+	v+	-	-	+/-
D-raffinosa	-	v-	v-	v+	-	v-	v-
Ramnosa	v-	-	-	v+	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	v	-	-	-
Sukrosa	v-	-	+	+	+	+	+
D-xilosa	v-	-	-	+	-	-	-

v: bervariasi antara positif dan negatif, v+: kebanyakan +, v-: kebanyakan -, td: tidak ada data, +/-: reaksi positif tidak terlalu kuat.

Untuk sementara semua isolat disebut sebagai *Enterococcus* sp. Dari informasi mengenai habitat atau sumber, *E. faecium* dilaporkan berasal dari kotoran manusia dan hewan termasuk insekta serta tanaman (Mundt 1986), tetapi ada juga yang berasal dari kecap koji dan moromi (Tanasupawat *et al.* 1992). Untuk menentukan nama jenis dari *Enterococcus* sp. perlu dilanjutkan terutama dengan menggunakan metoda yang lebih akurat, misalnya dengan menggunakan Biolog System untuk pengujian biokimiawi atau analisis sekuen 16S-rRNA. Di samping itu karakter *Enterococcus* sp. perlu dilengkapi dengan karakter yang lain. Semua strain *Enterococcus* sp. hasil penelitian ini disimpan dalam kondisi penyimpanan kering beku di Koleksi Kultur Puslitbang Bioteknologi-LIPI (BTCC).

## DAFTAR PUSTAKA

- Devriese, L.A. & B. Pot. 1995. The genus *Enterococcus*, hlm. 327-367. Di dalam: B.J.B. Wood & W.H. Holzapfel (ed.), *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. London: Blackie Academic & Professional.
- Hardie, J.M. & R.A. Whiley. 1997. Classification and Overview of the Genera *Streptococci* and *Enterococci*, hlm. 1-11. Di dalam: P.W.

- Andrew & T.J. Mitchell (ed.), *The Biology of Streptococci and Enterococci*. Suplemen *J. Appl. Bacteriol.* 83.
- Havenaar, R., B.T. Brink & J. H. J. Huis In't Veld.** 1992. Selection of strains for probiotic use, hlm. 225-257. Di dalam: R. Fuller (ed.), *Probiotics the Scientific Basis*. London: Chapman & Hall.
- Hungate, R.E.** 1966. The rumen bacteria, hlm. 8-81. Di dalam: *The Rumen and Its Microbes*. New York: Academic Press.
- Hungate, R.E.** 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, hlm. 118-132. Di dalam: J.R. Norris, & D.W. Ribbons (ed.), *Methods in Microbiology*, vol. 3B. New York: Academic Press.
- Kaldmae, H. & M. Vadi.** 1991. The biopreparation Cellobacterin in rations for calves, hlm.132-134. Di dalam: I. John (ed.), *Industrial Enzymes, Probiotics and Biological Additives*. Kaunas: Lithuanian Veterinary Medical Academy Kaunas dan Agricultural Faculty of Martin-Luther University Halle-Wittenberg.
- Kozaki, M., T. Uchimura & S. Okada.** 1992. *Nyuusankin Jikken Manual, Bunri Kara Doutei Made*. Tokyo: Asakura Shoten.
- Mitsuoka, T.** 1989. *Microbes in the Intestine*. Japan: Yakult Honsha Co., Ltd.
- Mundt, J.O.** 1986. Enterococci, hlm.1063-1068. Di dalam: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Stewart, C.S.** 1992. Lactic acid bacteria in the rumen, hlm. 49-68. Di dalam: B.J.B. Wood, (ed.), *The Lactic Acid Bacteria*, vol 1. London: Elsevier Applied Science.
- Tanasupawat, S., S. Okada, K-I. Suzuki, M. Kozaki & K. Komagata.** 1992. Identification of *Enterococcus hirae*, *E. faecalis*, *E. faecium* and *E. casseliflavus* Strains from Fermented Food. *Bull. JFCC* 8:86-94.