

Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Makanan Tradisional Khas Batak “Naniura” dan Uji Sensitifitas Terhadap Beberapa Antibiotik

Anjurniza Ulfa¹, Aloysius¹, Anggita Kasih Fianti Situmorang¹, Harmileni², Edy Fachrial^{3*}

¹ Fakultas Kedokteran, Program Studi Pendidikan Dokter, Universitas Prima Indonesia, Medan, Indonesia

² Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Teknologi Kimia Industri, Medan, Indonesia

³ Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Prima Indonesia, Medan, Indonesia

Email: *fachrial_edy@yahoo.co.id

Abstrak

Bakteri asam laktat dapat diisolasi dari berbagai macam produk makanan terutama yang mengalami fermentasi. Salah satu sumber bakteri asam laktat adalah makanan tradisional khas suatu daerah. Bakteri asam laktat berpotensi sebagai probiotik. Resistensi terhadap antibiotik adalah karakteristik utama sebagai probiotik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi bakteri asam laktat (BAL) dari makanan tradisional khas Batak “naniura” dan melakukan uji resistensi isolat BAL terhadap berbagai antibiotik. Hasil penelitian menunjukkan sebanyak sebanyak 107 CFU BAL berhasil diisolasi dari naniura. sebanyak 6 isolat BAL yaitu BN1, BN2, BN3, BN4, BN5 dan BN6 dipilih secara acak untuk dilakukan uji resistensi terhadap antibiotik. Seluruh isolat resisten terhadap amoksisilin dan cefotaxim. Isolat BN5 juga resisten terhadap ofloxacin. Seluruh isolat BAL sensitif terhadap erythromycin, oxacillin, dan gentamicin. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa BAL yang diisolasi dari naniura berpotensi sebagai probiotik yang ditunjukkan dengan adanya jumlah CFU yang mencukupi, tetapi BAL ini juga berpotensi sebagai reservoir gen resistensi antibiotik.

Kata Kunci: Naniura, Bakteri Asam Laktat, Probiotik, Antibiotik, Resistensi.

1. PENDAHULUAN

Antimikroba adalah istilah umum yang ditujukan ke setiap senyawa kimia, termasuk antibiotik, agen antimikroba, desinfektan, dan senyawa lain yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain. Disisi lain, antibiotik adalah senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri, jamur atau dapat berupa senyawa sintetik. Resistensi antibiotik mengacu kepada kemampuan suatu mikroorganisme untuk bertahan dari kondisi bakteristatik atau bakterisida antibiotik [1]. Sejak 50 tahun terakhir antibiotik digunakan untuk mengobati penyakit akibat mikroba. Meskipun demikian, penggunaan antibiotik yang berlebihan dapat memicu resistensi antibiotik pada bakteri patogen. Resistensi antibiotik dapat diperoleh melalui transfer gen secara in vivo antara flora normal pada saluran pencernaan dan bakteri patogen yang resisten antibiotik [2].

Bakteri Asam Laktat (BAL) adalah kelompok bakteri Gram positif yang meng eksresikan asam laktat sebagai produk fermentasi utama ke media. Kelompok utama bakteri ini termasuk *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Streptococcus*. BAL merupakan mikroorganisme yang paling sering digunakan dalam berbagai produk makanan fermentasi. adanya resistensi antibiotik merupakan suatu ancaman global karena mengurangi efisiensi terapi antibiotik, yang diperburuk dengan adanya transfer gen antibiotik resisten secara horizontal antar bakteri. Bakteri ini kemungkinan membawa gen antibiotik resisten yang dapat ditransfer ke bakteri patogen [3]. Pada umumnya, BAL yang tergolong probiotik tidak dapat membawa gen resisten antibiotik yang dapat di transfer dikarenakan gen tersebut dikode secara kromosomal. Meskipun begitu, beberapa laporan penelitian membuktikan bahwa probiotik yang digunakan atau terdapat dalam produk makanan tertentu membawa gen resisten antibiotik yang dapat ditransfer [4]. Mekanisme transfer horizontal pada bakteri di lingkungan alami adalah melalui konjugasi dan transduksi melalui *bacteriophage*. BAL dilaporkan mempunyai kemampuan untuk memindahkan gen resisten antimikroba tersebut ke bakteri pembusuk makanan (*food-borne pathogen bacteria*) atau bakteri patogen enterik [5].

Naniura adalah makanan tradisional khas Batak yang terbuat dari ikan yang tidak dimasak. Prinsip pembuatan naniura adalah merendam ikan mas dengan rendaman jeruk jingga atau asam dan dibiarkan beberapa jam. Penggunaan asam dalam proses pembuatan naniura bertujuan sebagai antimikroba. pH yang rendah pada pangan (<4,5) mampu menghambat pertumbuhan patogen sehingga makanan dapat disimpan lebih lama dibandingkan makanan dengan pH netral [6]. BAL yang terdapat pada ikan air tawar pada umumnya adalah *Lactobacillus* dan *Streptococcus*. Genus *Lactobacillus* memiliki banyak manfaat bagi kesehatan manusia, terutama dapat menghambat bakteri patogen. Bakteri ini juga banyak ditemukan dalam makanan tradisional di Asia yang mana sebagian besar merupakan probiotik yang potensial [7]. Meskipun demikian, perlu diinvestigasi lebih lanjut akan kemungkinan BAL yang diisolasi dari makanan tradisional khususnya naniura, resisten terhadap antibiotik yang menyebabkan adanya potensi dalam perpindahan gen resisten antibiotik antara BAL dengan bakteri patogen.

2. METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Isolasi BAL dari naniura

BAL diisolasi dari naniura dengan menggunakan media pertumbuhan spesifik *Lactobacillus* yaitu MRS broth dan MRS agar. Naniura diperoleh dari pedagang lokal di kota Medan. Sebanyak 1 g daging ikan naniura dilarutkan ke dalam 9 mL MRS broth steril dalam tabung reaksi, lalu diinkubasi dalam keadaan anaerob pada suhu 37°C selama 24 jam sehingga terbentuk kultur BAL. Setelah inkubasi, dilakukan pengenceran bertingkat. Secara ringkas, sebanyak 0,1 mL kultur BAL dicampurkan ke dalam 0,9 mL MRS broth steril di dalam microtube 1,5 mL. microtube dibolak balik hingga campuran homogen. Pengenceran ini adalah pengenceran 10⁻¹. Setelah homogen, diambil kembali 0,1 mL kultur BAL dari pengenceran 10⁻¹ lalu

dicampurkan dengan 0,9 mL MRS broth steril dan dibolak balik kembali sampai homogen. Ini merupakan pengenceran 10^{-2} . Pengenceran dilanjutkan hingga 10^{-7} . Pada pengenceran terakhir, dipipet 0,1 mL kultur BAL dan disebar pada permukaan media MRS agar dengan spreader dan diinkubasi pada suhu 37°C kondisi anaerob selama 48 jam. Setelah 48 jam, koloni BAL yang tumbuh dihitung untuk menentukan CFU dan dilanjutkan dengan pewarnaan Gram dan Uji katalase. CFU dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Colony Forming Unit (CFU)} = \text{total koloni BAL} \times \frac{1}{\text{pengenceran}} \times \frac{1}{\text{volume sampel}} \quad (1)$$

2.2 Gram staining dan Uji Katalase

Sebanyak 6 isolat BAL dipilih secara acak dan dilakukan re-streaking pada media MRS agar yang baru. Isolat BAL terpilih tersebut diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dan diberi kode BN1, BN2, BN3, BN4, BN5 dan BN6. Setelah isolat tumbuh, dilakukan uji Gram staining dan uji katalase.

2.3 Uji Sensitivitas Antibiotik

Uji sensitivitas antibiotik BAL dilakukan dengan metode difusi cakram. Sebanyak 1 ose yang terdiri dari 3-5 koloni BAL setiap isolat, dikultur ke dalam 10 mL MRS broth dalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam pada kondisi anaerob. setelah diinkubasi, isolat BAL di sebar secara merata ke permukaan MRS agar dalam cawan petri dengan menggunakan cotton swab steril. 6 jenis cakram antibiotik yang berdiameter 5 mm (AML, E, OX, OFX, CTX dan CN) diletakkan ke permukaan media MRS agar yang telah di swab dengan isolat BAL dengan menggunakan pinset. Cawan petri diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C . setelah inkubasi, zona hambat pertumbuhan BAL diukur dengan menggunakan jangka sorong.

3. ANALISA DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan proses enrichment dan pengenceran bertingkat, sebanyak 0,1 mL setiap kultur isolat BAL pada pengenceran terakhir disebar ke permukaan MRS agar dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C . dari hasil isolasi ini diperoleh CFU BAL dari naniura adalah $2,4 \times 10^7$ CFU/mL.



Gambar 1. Naniura, makanan tradisional khas Batak

Jumlah ini hampir sama dengan yang dilaporkan oleh Fachrial *et al* (2018). Dalam laporannya disebutkan bahwa BAL yang diisolasi dari fermentasi nira kelapa sawit memiliki BAL dengan jumlah CFU sebanyak $1,4 \times 10^7$ CFU/mL [8]. Desniar (2013) mengisolasi BAL dari bekasam, yaitu ikan fermentasi dan menguji aktivitas antimikroba BAL tersebut. Jumlah CFU BAL dalam bekasam diketahui $1,4 \times 10^8$ CFU/mL [9]. Menurut Tayo and Akpeji (2016), suatu makanan probiotik yang standar harus memiliki minimal 10^6 CFU/mL mikroorganisme BAL yang aktif dan hidup saat dikonsumsi [10]. Sarvari *et al* (2014) dalam laporannya menyatakan bahwa meskipun tidak ada standar khusus mengenai konsentrasi yang dibutuhkan untuk probiotik, jumlah CFU probiotik sebanyak 10^6 CFU/g disepakati merupakan jumlah minimum yang dibutuhkan agar dapat menimbulkan efek positif bagi kesehatan. Konsentrasi ini bersifat spesifik untuk setiap strain dan jumlah BAL yang dapat bertahan melalui saluran pencernaan adalah hal yang sangat penting. Beberapa faktor mempengaruhi viabilitas bakteri probiotik. pH yang rendah dari suatu makanan merupakan faktor yang terpenting yang menyebabkan menurunnya viabilitas probiotik [11].

Hasil pengujian Gram staining dan uji katalase terhadap ke-6 isolat BAL terpilih ditampilkan pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Gram staining dan uji katalase

Isolat	Gram Staining	Uji Katalase
BN1	Positif	Negatif
BN2	Positif	Negatif
BN3	Positif	Negatif
BN4	Positif	Negatif

Isolat	Gram Staining	Uji Katalase
BN5	Positif	Negatif
BN6	Positif	Negatif

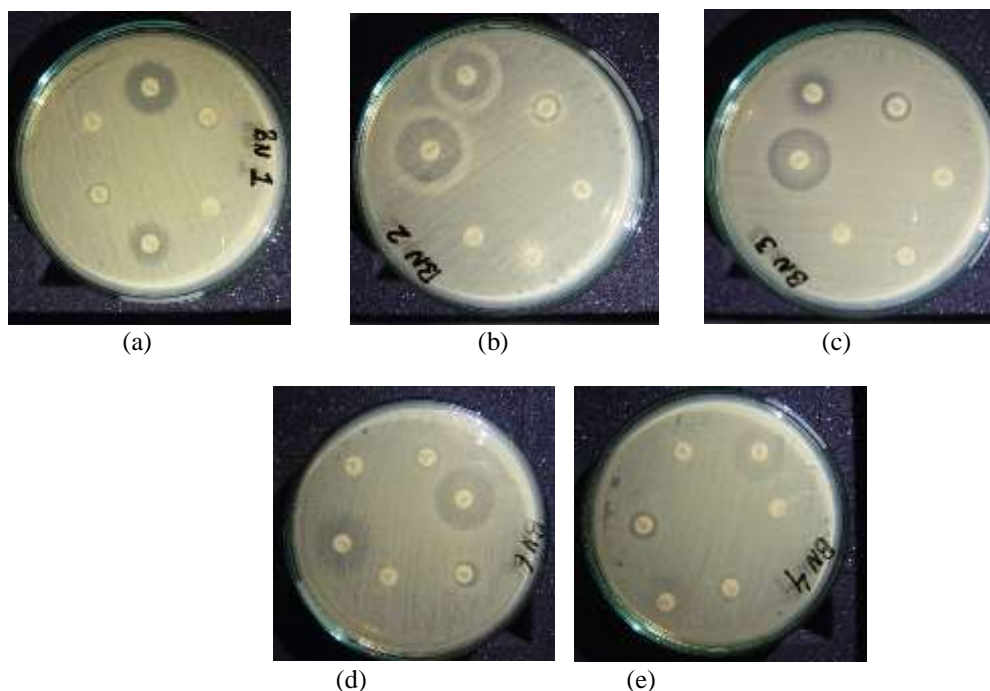
Dari tabel di atas, semua isolat menunjukkan hasil Gram positif dan katalase negatif. Syukur *et al* (2014) mengisolasi BAL dari “dadih”, makanan tradisional khas Sumatera Barat yang terbuat dari susu kerbau murni yang difermentasikan. Semua isolat BAL terpilih menunjukkan hasil Gram positif dan uji katalase negatif [12]. Pada dinding sel bakteri Gram positif, terkandung lapisan tebal peptidoglycan dengan sejumlah *cross linking* asam teikoat yang dapat menahan atau menyimpan warna pada proses pewarnaan, sehingga terbentuk warna ungu. Pada uji katalase tidak terdapat gelembung udara, hal ini mengindikasikan bahwa bakteri yang diisolasi adalah katalase negatif. Bakteri ini tidak mampu menguraikan H₂O₂ menjadi oksigen. Katalase negatif merupakan salah satu karakteristik dari *Lactobacillus* [13].

Uji sensitifitas antibiotik isolat BAL terpilih dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram. Terdapat 6 jenis antibiotik yang digunakan yaitu Amoxycillin (AML), erythromycin (E), Oxacillin (OX), Ofloxacin (OFX), Cefotaxime (CTX) dan Gentamicin (CN). Hasil pengujian sensitivitas antibiotik ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Diameter zona hambat oleh antibiotik

Isolat	Zona hambat (mm)					
	AML	E	OX	OFX	CTX	CN
BN1	0	18,5	13,6	7,5	0	9,2
BN2	0	21,0	17,6	8,9	0	10,2
BN3	0	19,3	12,1	7,9	0	10,9
BN4	0	18,1	17,5	10,1	0	10,1
BN5	0	21,6	11,9	0	0	10,1
BN6	0	22,2	15,1	10,52	0	10,2

Dari hasil di atas menunjukkan bahwa semua isolat BAL resisten terhadap antibiotik amoxicillin dan cefotaxime. Gambar hasil uji sensitivitas antibiotik dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil uji sensitivitas antibiotik isolat BAL

Bakteri dapat memiliki resistensi terhadap antibiotik dikarenakan mutasi gen spontan (tidak dapat ditransfer) atau transfer gen horizontal. Terdapat tiga mekanisme dalam transfer gen horizontal, yaitu konjugasi, transformasi dan transduksi. Konjugasi merupakan model transfer yang paling disukai dalam transfer gen dikarenakan gen resisten ini dapat dipindahkan melalui elemen mobile seperti transposon dan plasmid. BAL pada umumnya sensitif terhadap amoxicillin, tetapi dari hasil penelitian ini, BAL yang diisolasi dari naniura justru resisten terhadap amoxicillin. Amoxicillin tergolong antibiotik β -laktam yang targetnya adalah menghambat sintesis dinding sel bakteri. Pada *Lactobacillus*, beberapa gen resisten telah berhasil dikarakterisasi. *tet(M)* menandakan resistensi terhadap tetracycline, *erm(B)* menandakan resistensi terhadap erythromycin, dan *cat* menandakan resistensi terhadap chloramphenicol. Gen resisten ini juga berpotensi ditransferkan ke bakteri yang lain [14].

4. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa BAL yang diisolasi dari naniura memiliki pola resistensi antibiotik yang berbeda dari BAL yang selama ini ditemukan. 6 isolat BAL dari naniura diketahui resisten terhadap amoxicillin dan cefotaxime. Untuk penelitian selanjutnya disarankan untuk mendeteksi gen resisten yang terdapat pada plasmid dalam BAL tersebut.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih penulis ucapkan kepada Rektor Universitas Prima Indonesia, Dr Chrismis Novalinda Ginting, M.Kes, dan Dekan Fakultas Kedokteran dr Linda Chiuman, M.K.M yang telah memfasilitasi laboratorium sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada pembimbing utama sekaligus kepada Lab Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran, Bapak Edy Fachrial, S.Si.,M.Si atas ide dan motivasi dalam penelitian ini, kepada tim analis lab Biologi Molekuler Michael Alfian Grey dan Ditha Paramitha yang turut membantu dalam pelaksanaan penelitian

REFERENCES

- [1] S.A.Liasi. T.I. Azmi. M.D. Hassan. M. Shuhaimi. M. Rosfarizan. A.B.Ariff, "Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budu," *Malays. J. Microbiol.*, vol. 5, no. 1, pp. 33–37, 2009.
- [2] N. Shazali, H. L. Foo, T. C. Loh, D. W. Choe, and R. A. Rahim, "Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in Malaysia," *Gut Pathog.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–7, 2014.
- [3] Z.Erginkaya. E.U. Turhan. D. Tath, "Determination of antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from traditional Turkish fermented dairy products," *Iran. J. Vet. Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 53–56, 2018.
- [4] R. Ramachandra, B. Praveen, A.R. Rajunaik, B. Malashree, Lk. Prabha, "ANTIBIOTIC RESISTANCE IN PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA : A SAFETY CONCERN," no. 2, pp. 33–38, 2017.
- [5] G. Basbulbul. M. Ozteber. H.H. Biyik, "Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dairy products and boza," *J. Microbiol. Biotechnol. food Sci.*, vol. 5, no. 6, pp. 513–517, 2015.
- [6] M. B. Manalu, "Majalah Ilmiah Panorama Nusantara , edisi VII , Juli - Desember 2009," *Maj. Ilm. Panor. Nusant.*, vol. VII, pp. 52–61, 2009.
- [7] G. M. Febrian, E. Julianti, and H. Rusmarilin, "PENGARUH BERBAGAI JENIS ASAM JERUK DAN LAMA PERENDAMAN," *J. Rekayasa Pangan dan Pert.*, vol. 4, no. 4, pp. 471–482, 2016.
- [8] E. Fachrial. Adrian.Harmileni, "ISOLASI DAN AKTIVITAS ANTI MIKROBA BAKTERI ASAM LAKTAT DARI FERMENTASI NIRA KELAPA SAWIT," *Biolink*, vol. 5, no. 1, pp. 51–58, 2018.
- [9] Desniar. I.Rusmana. A.Suwanto. N.R. Mubarik, "Characterization of lactic acid bacteria isolated from an Indonesian fermented fish (bekasam) and their antimicrobial activity against pathogenic bacteria Characterization of lactic acid bacteria isolated from an Indonesian fermented fish (bekasam) an," *Emirates J. Food Agric.*, vol. 25, no. 6, pp. 489–494, 2013.
- [10] B. AdebayoTayo and S. Akpeji, "Probiotic Viability, Physicochemical and Sensory Properties of Probiotic Pineapple Juice," *Fermentation*, vol. 2, no. 4, p. 20, 2016.
- [11] M. R. Sarvari, F., Mortazavian, A. M., Fazeli, "Biochemical Characteristics and Viability of Probiotic and Yogurt Bacteria in Yogurt during the Fermentation and Refrigerated Storage," *Appl. Food Biotechnol.*, vol. 1, no. 1, pp. 55–61, 2014.
- [12] S.Syukur. E.Fachrial. Jamsari, "Isolation , Antimicrobial Activity and Protein Bacteriocin Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dadih in Solok , West Sumatera , Indonesia .," *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, vol. 5, no. 6, pp. 1096–1104, 2014.
- [13] M. Thakur. H.W. Deshpande. M.A. Bhate, "Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria and their Exploration in Non- Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria and their Exploration in Non-Dairy Probiotic Drink," *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 6, no. April, p. 4, 2017.
- [14] N. M. Jose, C. R. Bunt, and M. A. Hussain, "Implications of Antibiotic Resistance in Probiotics," *Food Rev. Int.*, vol. 31, pp. 52–62, 2014.