

POTENSI LACTOBACILLUS YANG DIISOLASI DARI AIR SUSU IBU UNTUK MENCEGAH DIARE

[Potential of Lactobacillus Isolated from Breast Milk to Prevent Diarrhea]

Lilis Nuraida^{1,2)*}, Hana^{1,2)}, Apriliana W. Hartanti²⁾ dan Endang Prangdimurti^{1,2)}

¹⁾ South East Asian Food and Agriculture Science and Technology (SEAFST) Center, Institut Pertanian Bogor, Bogor

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

Diterima 09 Desember 2011 / Disetujui 03 Desember 2012

ABSTRACT

Some of *Lactobacillus* species isolated from breast milk are known to have antimicrobial activities, including against *Escherichia coli*. The aims of this study were to evaluate the antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from breast milk against enteropathogenic *Escherichia coli* strain K1.1 and the effectiveness of the *Lactobacillus* isolates to prevent diarrhea on rats (*Sprague Dawley*). The infective dose of *E. coli* K1.1 to induce diarrhea without causing death were also determined. Based on the antimicrobial activity there were three isolates of *Lactobacillus* that exhibited good inhibition against *E. coli* K1.1, i.e. *Lactobacillus rhamnosus* R14, *L. rhamnosus* R23, and *L. rhamnosus* B16. Determination of *E. coli* infective dose showed that 10^8 CFU of *E. coli* K1.1 was sufficient to induce diarrhea on rat without causing death. The number of diarrhea rats and severity level in group treated with *L. rhamnosus* were lower than groups untreated with the *Lactobacilli*. This study showed that the three *L. rhamnosus* isolated from breast milk were able to prevent diarrhea due to infection of *E. coli* K1.1 when the *Lactobacillus* was regularly introduced prior to infection. *L. rhamnosus* R23 showed the best capabilities of preventing diarrhea in rats as compared to two other isolates of *Lactobacillus*. The incidence of diarrhea correlated with the number of lactobacilli in the feces. However when the period of diarrhea ceased, there were no difference in total lactobacilli and *E. coli* in the caecum, colon and feces between rats treated with *L. rhamnosus* and the control. This finding revealed the *L. rhamnosus* isolated from breast milk were potential for prevention of diarrhea when consumed regularly.

Keywords: antimicrobial activity, breast milk, diarrhea, *E. coli*, *Lactobacillus rhamnosus*

ABSTRAK

Beberapa spesies *Lactobacillus* yang diisolasi dari air susu ibu (ASI) diketahui memiliki aktivitas antimikroba, termasuk terhadap *Escherichia coli*. Tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi aktivitas antimikroba spesies *Lactobacillus* asal ASI terhadap *Escherichia coli* enteropatogenik strain K1.1 dan efektivitas *Lactobacillus rhamnosus* untuk mencegah diare pada tikus (*Sprague Dawley*). Dosis infeksi *E. coli* K1.1 yang dapat menginduksi diare tanpa menyebabkan kematian juga ditentukan. Berdasarkan aktivitas antimikroba, diperoleh tiga isolat *Lactobacillus* yang memiliki penghambatan yang baik terhadap *E. coli* K1.1, yaitu *Lactobacillus rhamnosus* R14, *L. rhamnosus* R23, dan *L. rhamnosus* B16. Penentuan dosis infeksi oleh *E. coli* menunjukkan bahwa sebanyak 10^8 CFU *E. coli* K1.1 merupakan jumlah yang cukup untuk menginduksi diare pada tikus tanpa menyebabkan kematian. Jumlah tikus yang mengalami diare dan keparahannya pada tikus yang diberi *L. rhamnosus* lebih rendah dibandingkan dengan tikus yang tidak diberi *L. rhamnosus* namun diinfeksi dengan *E. coli* K1.1. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tiga *L. rhamnosus* asal ASI mampu menghambat diare karena *E. coli* K1.1 jika *Lactobacillus* tersebut diberikan secara reguler sebelum terjadinya infeksi. *L. rhamnosus* R23 merupakan isolat dengan kemampuan yang paling baik dalam mencegah diare dibandingkan dengan dua isolat *L. rhamnosus* lainnya. Jumlah tikus yang mengalami diare berkorelasi dengan jumlah laktobasili di dalam feses. Akan tetapi jika periode diare telah berhenti, tidak ada perbedaan jumlah total laktobasili dan *E. coli* dalam sekum, kolon dan feses antara tikus yang diberi *L. rhamnosus* dan kontrol. Penelitian ini menunjukkan bahwa *L. rhamnosus* asal ASI berpotensi untuk mencegah diare jika dikonsumsi secara reguler.

Kata kunci: aktivitas antimikroba, air susu ibu, diare, *E. coli*, *Lactobacillus rhamnosus*

PENDAHULUAN

Diare dan gastroenteritis karena infeksi tertentu menjadi urutan pertama penyebab rawat inap di rumah sakit di Indonesia, bahkan pada tahun 2006 penyakit ini menempati urutan ketiga penyakit utama penyebab kematian di rumah sakit di Indonesia setelah stroke dan perdarahan intrakranial (Depkes RI, 2008). Baik di negara berkembang, maupun di negara maju penyebab diare yang utama pada anak-anak adalah

Escherichia coli, Rotavirus, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Entamoeba histolytica* dan *Giardia lamblia* (Mandomando *et al.*, 2007; Allen *et al.*, 2010). *E. coli* enteropatogenik diketahui sebagai penyebab utama diare pada anak-anak berumur kurang dari dua tahun (Yatsuyanagi *et al.*, 2003). Mikroba probiotik telah terbukti dapat mencegah atau menyembuhkan diare yang diakibatkan oleh infeksi patogen, virus maupun diare yang disebabkan oleh konsumsi antibiotik (Heyman dan Menard, 2002; de Vrese dan Marteau, 2007; Zanini *et al.*, 2007). Penggunaan probiotik untuk mencegah atau mengobati diare merupakan fungsi probiotik yang paling umum diaplikasikan (Reid *et al.*, 2003; de Vrese dan Marteau, 2007).

*Korespondensi Penulis :
E-mail : lilis@seafast.org; lilis@nuraida.com; Hp: 081-1118583

Pemberian probiotik dapat mengurangi durasi dan keparahan diare (de Vrese dan Marteau, 2007; Allen *et al.*, 2010).

Air susu ibu (ASI) telah dilaporkan oleh beberapa peneliti mengandung bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai probiotik. *Bifidobacterium longum* adalah bakteri asam laktat (BAL) yang paling umum ditemukan dalam ASI, diikuti oleh *B. animalis*, *B. bifidum*, dan *B. catenulatum* (Gueimonde *et al.*, 2007). Keberadaan laktobasili pada ASI yaitu *L. gasseri*, *L. fermentum* dan *L. salivarius* dilaporkan oleh Martin *et al.* (2005). Isolat ini berpotensi sebagai probiotik yang sama dengan strain yang telah digunakan secara konvensional (Martin *et al.*, 2005). Hartanti (2010) menunjukkan dari 19 isolat BAL asal ASI yang memiliki ketahanan terhadap asam dan atau garam empedu, 5 isolat yaitu *L. rhamnosus* R14, R21, R23, B16 dan *Lactobacillus sp.* R25 dapat menurunkan *E. coli* K1.1 sebesar >2 log CFU/mL ketika ditumbuhkan secara bersama-sama pada media susu. Isolat *Lactobacillus* yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *E. coli* K1.1 secara *in vitro* diharapkan mampu mencegah diare secara *in vivo*. Sebagaimana dipersyaratkan FAO/WHO (2002), dalam pengembangan bakteri probiotik, studi mengenai karakterisasi sifat fungsional bakteri asam laktat harus dilakukan pada hewan percobaan terlebih dahulu. Pemberian *Lactobacillus casei* I-5 dilaporkan efektif untuk mencegah infeksi karena *E. coli* pada tikus (Ishida-Fujii *et al.*, 2007). Sementara itu Oyetayo (2004) menunjukkan tikus yang diberi *Lactobacillus acidophilus* dan diinfeksi *E. coli*, tidak mengalami diare seperti yang dialami oleh tikus yang hanya diberi *E. coli*. Penelitian yang dilakukan oleh Astawan *et al.* (2011) menunjukkan bahwa pemberian BAL yang diisolasi dari daging segar dapat menekan tingkat keparahan diare pada tikus akibat infeksi *E. coli* enteropatogenik. Pada penelitian tersebut paparan *E. coli* dilakukan selama tujuh hari berturut-turut dengan jumlah *E. coli* sebanyak 10^6 CFU/mL per hari. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas isolat *Lactobacillus* asal ASI untuk mencegah diare pada tikus percobaan yang diinfeksi dengan *E. coli* K1.1. Pada penelitian ini infeksi oleh *E. coli* K1.1. dilakukan dengan paparan tunggal dengan dosis yang dapat menyebabkan diare. Paparan secara tunggal dilakukan untuk menghindari terjadinya imunitas pada tikus yang digunakan terhadap *E. coli*, karena paparan terhadap mikroorganisme yang berkali-kali dapat memicu terjadinya imunitas.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Lima isolat *Lactobacillus* asal ASI yaitu *L. rhamnosus* (R14, R21, R23, dan B16) dan *Lactobacillus sp.* R25 dari koleksi SEAFast Center IPB digunakan dalam penelitian ini. Bakteri yang digunakan untuk menginduksi diare adalah *Escherichia coli* enteropatogenik strain K1.1 yang berasal dari Laboratorium Bioteknologi Hewan dan Biomedis Pusat Penelitian Bioteknologi IPB dan tikus percobaan *Sprague-Dawley* jantan dari Pusat Studi Biofarmaka IPB. Bahan-bahan yang digunakan adalah bahan penyusun ransum modifikasi AIN-76 (AIN, 1977) dan media untuk uji mikrobiologi. Alat-alat yang dipergunakan dalam

penelitian ini adalah peralatan untuk pengujian mikrobiologi dan pemeliharaan hewan percobaan.

Pengujian aktivitas antimikroba *Lactobacillus* terhadap *E. coli* K1.1 secara *in vitro*

Pengujian aktivitas antibakteri *Lactobacillus* terhadap *E. coli* K1.1 dilakukan dengan metode kontak. Kultur *Lactobacillus* dan *E. coli* disebarkan masing-masing ke dalam medium MRSB dan NB dan diinkubasi selama 24 jam. Isolat *Lactobacillus* dan kultur *E. coli* kemudian ditambahkan ke dalam tabung berisi larutan susu skim 10% sehingga susu mengandung 10^8 CFU/mL *Lactobacillus* dan 10^5 CFU/mL *E. coli*, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Susu dipilih sebagai medium dalam pengujian ini karena kedua bakteri dapat tumbuh dengan baik. Total *Lactobacillus* dan *E. coli* sebelum dan sesudah inkubasi dihitung dengan metode agar tuang masing-masing menggunakan media MRSA dan EMBA.

Penentuan dosis *E. coli* K1.1 yang menyebabkan diare pada tikus (modifikasi Oyetayo, 2004)

Protokol penggunaan tikus dalam penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan Kemenkes (No. Lb.03.04/KE/6224/2010). Uji dosis dilakukan dengan pemberian *E. coli* pada beberapa konsentrasi sehingga tikus menjadi diare. Pada uji ini digunakan 20 ekor tikus yang terbagi dalam empat kelompok, yaitu satu kelompok kontrol yang hanya diberikan larutan fisiologis (NaCl 0,85%) dan tiga kelompok tikus yang diberi *E. coli* dengan berbagai konsentrasi (10^8 , 10^7 dan 10^6 CFU/mL). Sebelum pemberian *E. coli* tikus diadaptasikan dahulu selama dua minggu dengan pemberian ransum standar AIN-76 (AIN, 1977) yang telah dimodifikasi secara *ad libitum* dan air minum dalam kemasan. *E. coli* K1.1 ditumbuhkan pada medium NB selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian disentrifuse dan pelet sel disuspensikan pada larutan garam fisiologis serta diencerkan sesuai dengan jumlah sel yang diinginkan. Pemberian suspensi *E. coli* sebanyak 1 mL sesuai dengan konsentrasi di atas dilakukan dengan cara dicekok (dengan alat sonde intragastrik). Pemberian *E. coli* hanya dilakukan sekali. Tikus kelompok kontrol dicekok dengan 1 mL larutan fisiologis (NaCl 0,85%). Pengamatan feses tikus dilakukan sebelum pemberian *E. coli* K1.1 (H0/hari ke 0) dan setiap hari setelah pemberian *E. coli* sampai lima hari (H5/hari ke 5).

Pengujian potensi isolat *Lactobacillus* asal ASI untuk mencegah diare

Pada uji aktivitas antidiare 30 ekor tikus dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kelompok tikus yang tidak diintervensi *L. rhamnosus* maupun *E. coli* (kontrol negatif), kelompok tikus yang diintervensi *E. coli* tetapi tidak diintervensi isolat *L. rhamnosus* (kontrol *E. coli*), dan tiga kelompok tikus yang diintervensi *E. coli* dan *L. rhamnosus* sebagaimana disajikan pada Tabel 1. Jumlah *E. coli* yang diberikan adalah 10^8 CFU sesuai dengan dosis yang menyebabkan diare dan jumlah *L. rhamnosus* yang diberikan adalah 10^9 CFU. Isolat *Lactobacillus* ditumbuhkan dalam MRSB pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu disentrifuse dan pelet sel disuspensikan dalam larutan fisiologis (NaCl 0,85%). Pemberian *L. rhamnosus* dan *E. coli* dilakukan

dengan cara dicekok. Tikus kelompok kontrol yang tidak diberi *E. coli* maupun *Lactobacillus*, dicekok dengan larutan fisiologis. Pengamatan dilakukan terhadap berat badan tikus (setiap dua hari), konsumsi ransum (setiap hari), konsistensi dan warna feses (setiap hari), serta jumlah total *Lactobacillus* dan *E. coli* pada feses sebelum diintervensi *L. rhamnosus* (H0/hari ke 0), setelah intervensi *L. rhamnosus* pada H1, H3, H7 dan setelah intervensi *E. coli* pada H8, H9, H10, H11, dan H12. Pada H12, setelah terjadi penyembuhan diare, tikus diterminasi dengan teknik dislokasi tulang aksis (*cervicalis dislocation*). Jumlah total *Lactobacillus* dan *E. coli* pada kolon dan sekum tikus selanjutnya dihitung dan analisis dengan program SPSS 13,0 dan uji beda lanjut dengan uji Duncan. Pengamatan kolon tikus dengan menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscope*) dilakukan pada pengamatan H12.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas antimikroba isolat *Lactobacillus* terhadap *E. coli* K1.1 secara *in vitro*

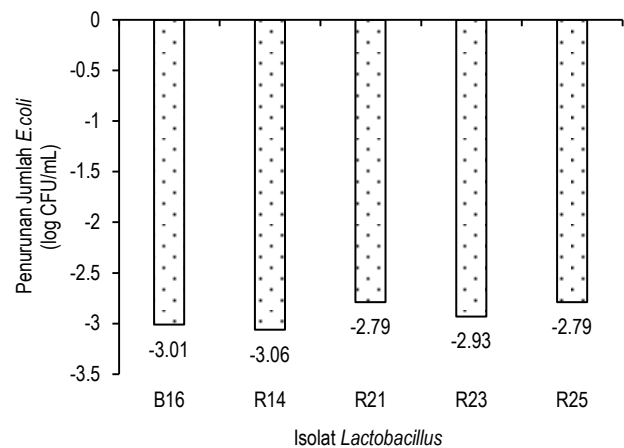
Hasil pengujian aktivitas antimikroba isolat *Lactobacillus* terhadap *E. coli* K1.1 dengan menggunakan metode kontak menunjukkan bahwa tiga isolat yaitu *L. rhamnosus* R14, *L. rhamnosus* R23, dan *L. rhamnosus* B16 (Gambar 1) memiliki penghambatan lebih tinggi atau menurunkan jumlah *E. coli* yang lebih besar dari 2 isolat lainnya. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sifat antimikroba tergantung pada strain. Hal yang sama terjadi pada *Lactobacillus* asal ASI yang dilakukan oleh peneliti terdahulu (Olivares *et al.*, 2006). Ketiga isolat tersebut selanjutnya digunakan untuk pengujian secara *in vivo* potensi *Lactobacillus rhamnosus* asal ASI sebagai anti-diare.

Dosis *E. coli* K1.1 yang menyebabkan diare pada tikus

Hasil pengujian menunjukkan pemberian dosis *E. coli* K1.1 sebesar 10^8 CFU menyebabkan 4 dari 5 tikus diare sehari setelah pemberian *E. coli* (Tabel 2). Semakin menurun dosis yang diberikan jumlah tikus yang diare pada hari pertama semakin kecil. Pada umumnya tikus mengalami diare selama 2 hari, lalu sembuh pada hari-hari berikutnya. Pada pemberian dosis 10^6 CFU, terjadi keterlambatan terjadinya diare yang terlihat dari tidak adanya tikus yang diare sehari setelah pemberian *E. coli*. Pada hari kedua baru terjadi diare pada 1 dari 5 tikus, lalu meningkat menjadi 3 dan turun kembali pada hari-hari berikutnya yang menunjukkan terjadinya penyembuhan. Pola yang tidak teratur diamati pada pemberian dosis 10^7 CFU. Untuk penelitian pada tahap selanjutnya digunakan dosis 10^8 CFU

yang merupakan dosis *E. coli* K1.1 yang dapat menimbulkan diare terbanyak pada tikus tanpa menimbulkan kematian.

Dosis *E. coli* K1.1 sebesar 10^6 CFU belum menyebabkan diare dalam waktu sehari setelah pemberian *E. coli*. Diare baru terjadi ketika digunakan dosis 10^7 atau 10^8 CFU. Dosis tinggi yang dibutuhkan pada penelitian ini kemungkinan disebabkan karena tikus yang digunakan pada penelitian ini bukan tikus bebas mikroba (*germ free*) atau gnotobiotik, yaitu hewan yang mengandung mikroba yang diketahui jenisnya atau spesiesnya (Zhang *et al.*, 2008). Respon imun terhadap infeksi pada hewan gnotobiotik lebih rendah daripada hewan yang dipelihara secara konvensional (Zhang *et al.*, 2008). Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus yang dipelihara secara konvensional sehingga kemungkinan sudah terpapar berbagai jenis bakteri, sebagai akibatnya dosis untuk menyebabkan sakit menjadi lebih tinggi. Ishida-Fujii *et al.* (2007) menggunakan dosis tinggi yaitu 3×10^7 - 1×10^8 sel *E. coli* untuk pengujian pencegahan infeksi *E. coli* pada tikus oleh *Lactobacillus casei* I-5.



Gambar 1. Penurunan jumlah *E. coli* K1.1 setelah dikompetisikan dengan 5 isolat *Lactobacillus* asal ASI secara *in vitro*

Tabel 2. Hasil pengujian dosis *E. coli* K1.1 yang menyebabkan tikus diare

Dosis <i>E. coli</i> K1.1 per hari	Jumlah Tikus Diare/Jumlah Seluruh Tikus Setelah Pemberian <i>E. coli</i> K1.1 Selama:				
	1 Hari	2 hari	3 Hari	4 Hari	5 hari
Kontrol	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
10^6 CFU	0/5	1/5	3/5	2/5	1/5
10^7 CFU	2/5	0/5	1/5	0/5	2/5
10^8 CFU	4/5	2/5	0/5	0/5	0/5

Tabel 1. Perlakuan tikus pada pengujian potensi isolat *L. rhamnosus* asal ASI untuk mencegah diare karena *E. coli* K1.1

Kelompok Perlakuan	Periode (Hari ke)			
	Adaptasi* (H-14 s.d. H0)	Perlakuan 1 (H1 s.d. H6)	Perlakuan 2 (H7)	Perlakuan 3 (H8 s.d. H12)
Kontrol negatif		ransum standar	ransum standar	ransum standar
Kontrol <i>E. coli</i>			ransum standar + <i>E. coli</i> K1.1. 10^8 CFU	
<i>L. rhamnosus</i> R14	ransum standar	ransum standar + <i>L. rhamnosus</i> 10^9 CFU	ransum standar + <i>E. coli</i> K1.1. 10^8 CFU + <i>L. rhamnosus</i> 10^9 CFU	ransum standar + <i>L. rhamnosus</i> 10^9 CFU
<i>L. rhamnosus</i> R23				
<i>L. rhamnosus</i> B16				

Keterangan: *) Dilakukan selama dua minggu dari H-14 sampai H0

Pengaruh pemberian asupan isolat *Lactobacillus* asal ASI terhadap kejadian diare akibat infeksi *E. coli* K1.1

Selama masa pengujian aktivitas antidiare berat badan tikus terus meningkat dan tidak terjadi penurunan berat badan walaupun sudah diinfeksi dengan *E. coli* K1.1. Berdasarkan penampakan feces, diare yang ditimbulkan tidak mengakibatkan tikus banyak kekurangan cairan, sehingga berat badan tikus masih mengalami peningkatan selama perlakuan.

Hasil pengujian (Tabel 3) menunjukkan bahwa ketiga isolat *L. rhamnosus* memiliki kemampuan untuk mencegah diare. Hal ini terlihat dari jumlah tikus yang mengalami diare, tingkat keparahan diare, dan waktu munculnya diare tersebut. Diare pada tikus kelompok kontrol *E. coli* terjadi segera setelah pemberian *E. coli* K1.1 (tiga dari enam tikus mengalami diare pada H8). Sedangkan diare pada tikus kelompok *L. rhamnosus* R14 baru terjadi pada H10 (satu dari enam tikus mengalami diare pada hari ke 10). Kelompok tikus yang diberi *L. rhamnosus* B16 juga mengalami diare segera setelah diberi *E. coli* K1.1 (H8), akan tetapi jumlah tikus yang diare lebih sedikit (dua dari enam tikus). Disamping itu, keparahan diare antara kelompok kontrol *E. coli* dengan kelompok yang diberi *L. rhamnosus* berbeda. Tikus kelompok kontrol *E. coli* mengalami diare yang lebih parah, yaitu ditunjukkan dengan penampakan feces yang tidak berbentuk, sangat lembek dan berlendir (tipe 6 berdasarkan Bristol Stool Chart (Lewis dan Heaton, 1997)). Sedangkan tikus yang diberi *L. rhamnosus* R14 dan *L. rhamnosus* B16 mengalami diare yang lebih ringan, yaitu fecesnya lembek namun masih berbentuk (tipe 5 berdasarkan Bristol Stool Chart (Lewis dan Heaton, 1997)). Pada umumnya tikus menderita diare hanya selama 1-2 hari (Tabel 3), sehingga setelah 5 hari dari pemberian *E. coli* (H12), tidak ada lagi tikus yang diare. Kelompok tikus yang diberi isolat *L. rhamnosus* R23 tidak mengalami diare selama pengujian berlangsung. Hal ini menunjukkan bahwa *L. rhamnosus* R23 memiliki kemampuan yang paling baik dalam mencegah diare. Kemampuan probiotik untuk mencegah diare karena bakteri atau virus tergantung pada strain dan dosis yang digunakan (Allen *et al.*, 2010).

E. coli enteropatogenik memiliki plasmid yang mengkode pembentukan pili untuk penempelan bakteri pada sel epitel dan produksi protein yang diperlukan untuk menyebabkan luka

(lesion) (Nguyen *et al.*, 2006). Budiarti dan Mubarik (2007) menunjukkan *E. coli* K1.1 dapat menghasilkan enzim protease ekstra seluler yang dapat mendegradasi mucin sehingga dapat melekat pada sel epitel usus dan menimbulkan diare pada inang. Michail dan Abernathy (2002) menguji efek penghambatan *L. plantarum* terhadap *E. coli* dan respon sekretori sel epitel usus menggunakan model sel Caco-2. Paparan *L. plantarum* diberikan sebelum, bersamaan dan setelah infeksi *E. coli*.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa *L. plantarum* mengurangi perubahan respon sekretori terhadap infeksi *E. coli*, kemungkinan melalui penghambatan pengikatan *E. coli* enteropatogenik pada sel epitel. *L. plantarum* juga mengurangi pengikatan *E. coli* pada sel Caco-2. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa *L. plantarum* menghambat migrasi neutrofil sehingga menghambat respon inflamasi karena infeksi *E. coli* enteropatogenik (Michail dan Abernathy, 2003). Akan tetapi efek ini hanya dapat terjadi jika probiotik tersebut telah diberikan sebelum infeksi *E. coli* (preventif). Sherman *et al.* (2005) menunjukkan *L. acidophilus* dan *L. rhamnosus* mencegah terjadinya luka pada sel epitel karena infeksi *E. coli*.

Pengaruh pemberian asupan isolat *Lactobacillus* asal ASI dan *E. coli* K1.1 terhadap jumlah *E. coli* dalam feces

Jumlah *E. coli* pada tikus selama pengujian disajikan pada Gambar 2. Pada kelompok kontrol negatif (selama pengujian seluruh tikus hanya diberikan larutan fisiologis), jumlah *E. coli* cenderung stabil. Kelompok kontrol *E. coli* (kelompok tikus yang diberi *E. coli* K1.1 tanpa diberi *L. rhamnosus*) menunjukkan kenaikan jumlah *E. coli* pada feces yang cukup tinggi, yaitu 0,83 log CFU/g feces (Tabel 4) sehari setelah pemberian *E. coli* (pengamatan H8). Hal ini berkorelasi dengan jumlah tikus yang mengalami diare pada pengamatan H8 yang berjumlah 3 ekor dari 6 ekor tikus (Tabel 4). Penelitian Oyetayo *et al.* (2003) menunjukkan pemberian *L. acidophilus* dan *L. casei* yang diisolasi dari susu sapi selama 3 hari berturut-turut, menurunkan jumlah enterobacteriaceae dalam feces tikus. Pemberian *L. acidophilus* juga mencegah terjadinya diare pada tikus (Oyetayo, 2004).

Tabel 3. Pengaruh pemberian isolat *Lactobacillus* asal ASI terhadap kejadian diare akibat infeksi *E. coli* K1.1

Kelompok Tikus	Jumlah Tikus Diare/Jumlah Seluruh Tikus									
	Pemberian Asupan <i>Lactobacillus</i> (Hari ke)									
	H0	H1	H3	H7	H8	H9	H10	H11	H12	
Kontrol negatif	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Kontrol <i>E. coli</i>	0/6	0/6	0/6	0/6	3/6 ^(a)	1/6 ^(a)	0/6	0/6	0/6	0/6
<i>L. rhamnosus</i> R14	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6 ^(b)	2/6 ^(b)	0/6	0/6
<i>L. rhamnosus</i> R23	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
<i>L. rhamnosus</i> B16	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6 ^(b)	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

Infeksi *E. coli* K1.1

Keterangan :

(a) = feces tidak berbentuk, berwarna agak kecoklatan, sangat lembek, berlendir (tipe 6 berdasarkan Bristol Stool Chart)

(b) = feces berbentuk bulat atau lonjong, berwarna hitam, tidak padat, lembek (tipe 5 berdasarkan Bristol Stool Chart)

Tabel 4. Jumlah tikus diare dan perubahan jumlah *E. coli* dan *Lactobacillus* pada feses setelah pemberian *E. coli* K1.1

Kelompok Perlakuan	Setelah 1 Hari (H8)			Setelah 2 Hari (H9)			Setelah 3 Hari (H10)			Setelah 4 Hari (H11)			Setelah 5 Hari (H12)		
	FD	Δ EC	Δ LB	FD	Δ EC	Δ LB	FD	Δ EC	Δ LB	FD	Δ EC	Δ LB	FD	Δ EC	Δ LB
Kontrol negatif	0/6	0,21	0,16	0/6	0,02	0,20	0/6	-0,58	-0,16	0/6	-0,35	-0,47	0/6	-0,58	-0,53
Kontrol <i>E. coli</i>	3/6 ^(a)	0,83	-1,29	1/6 ^(a)	0,59	-1,71	0/6	0,32	-1,42	0/6	0,11	-0,97	0/6	-0,4	-0,88
<i>L. rhamnosus</i> R14	0/6	0,44	-0,07	0/6	0,43	0,31	1/6 ^(b)	-0,42	0,39	2/6 ^(b)	-0,12	0,19	0/6	-0,22	0,34
<i>L. rhamnosus</i> R23	0/6	-0,13	-0,09	0/6	-0,57	0,38	0/6	-1,00	-0,19	0/6	-1,3	-0,10	0/6	-1,53	0,30
<i>L. rhamnosus</i> B16	2/6 ^(b)	0,36	-0,07	0/6	0,43	0,07	0/6	0,11	-0,11	0/6	-0,47	-0,15	0/6	-0,52	0,08

Keterangan :

FD = frekuensi kejadian diare (jumlah tikus diare/jumlah seluruh tikus)

Δ EC = selisih jumlah *E. coli* dalam feses (log CFU/g) pada hari tersebut dibandingkan dengan sebelum paparan terhadap *E. coli* K1.1 (H7)

Δ LB = selisih jumlah *Lactobacillus* dalam feses (log CFU/g) pada hari tersebut dibandingkan dengan sebelum paparan terhadap *E. coli* K1.1 (H7)

(a) = feses tidak berbentuk, berwarna agak kecoklatan, sangat lembek, berlendir (tipe 6 berdasarkan Bristol Stool Chart)

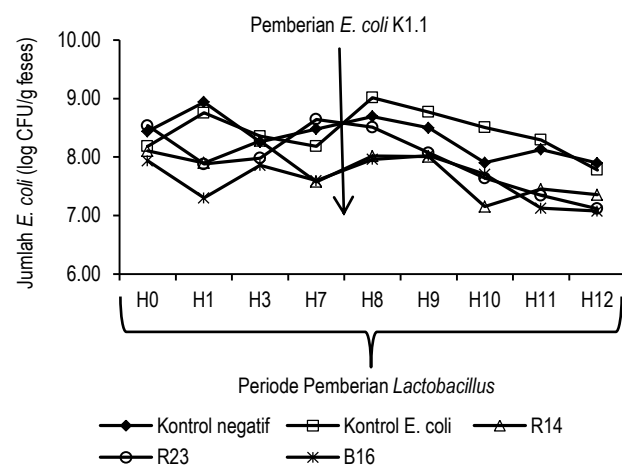
(b) = feses berbentuk bulat atau lonjong, berwarna hitam, tidak padat, lembek (tipe 5 berdasarkan Bristol Stool Chart)

Pada kelompok tikus yang diberi *L. rhamnosus* R14 menunjukkan sedikit kenaikan jumlah *E. coli* sehari setelah pemberian *E. coli* K1.1, yaitu sebesar 0,44 log CFU/g feses (Tabel 4), tetapi kemudian turun kembali setelah 3 hari (pada pengamatan H10). Hal ini berkorelasi dengan tidak adanya tikus yang mengalami diare pada pengamatan H8 meskipun pada H10 dan H11 terdapat masing-masing seekor dan 2 ekor tikus yang mengalami diare, tetapi gejala diare yang tampak hanya feses yang sedikit lembek dengan bentuk normal atau tipe 5 berdasarkan Bristol Stool Chart (Tabel 4). Pada kelompok tikus yang diberi *L. rhamnosus* R23 menunjukkan sedikit penurunan jumlah *E. coli* sehari setelah pemberian *E. coli* K1.1 (pengamatan H8), yaitu turun sebesar 0,13 log CFU/g feses (Tabel 4) dan terus mengalami penurunan sampai H12. Hal ini berkorelasi dengan tidak adanya satu ekor tikuspun yang mengalami diare setelah diberi *E. coli* K1.1. Pada kelompok tikus yang diberi asupan *L. rhamnosus* B16 menunjukkan sedikit kenaikan jumlah *E. coli* sehari setelah intervensi *E. coli* K1.1 (pengamatan H8), yaitu sebesar 0,36 log CFU/g feses (Tabel 4), tetapi kemudian mengalami penurunan hingga H12. Hal ini berkorelasi dengan adanya 2 ekor tikus yang mengalami diare pada H8 tetapi gejala diare yang tampak hanya feses yang sedikit lembek dengan bentuk normal atau tipe 5 berdasarkan Bristol Stool Chart sama seperti diare pada kelompok tikus yang diberi asupan *L. rhamnosus* R14 (Tabel 4). Pada H12 atau setelah 5 hari pemberian *E. coli* K1.1, tidak ada lagi tikus yang mengalami diare. Pada H12 jumlah *E. coli* pada feses tikus berkisar antara 7,07-7,90 log CFU/g feses, dengan jumlah *E. coli* yang lebih rendah pada kelompok tikus yang diberi *L. rhamnosus* (Gambar 2), yaitu 7,07-7,35 log CFU/g feses, dibandingkan dengan kedua kontrol yaitu sebesar 7,78 dan 7,90 log CFU/g feses.

Pengaruh pemberian asupan isolat *Lactobacillus* asal ASI dan *E. coli* K1.1 terhadap jumlah *Lactobacillus* dalam feses tikus

Jumlah *Lactobacillus* pada tikus selama pengujian disajikan pada Gambar 3. Pada kelompok kontrol negatif jumlah *Lactobacillus* cenderung stabil, sedangkan pada kelompok kontrol *E. coli* terjadi penurunan jumlah *Lactobacillus* yang sangat drastis setelah pemberian *E. coli* K1.1, yaitu sebesar 1,29 log CFU/g feses pada pengamatan H8 dan turun sebesar 1,71 log CFU/g pada H9 (Tabel 4), meskipun kemudian

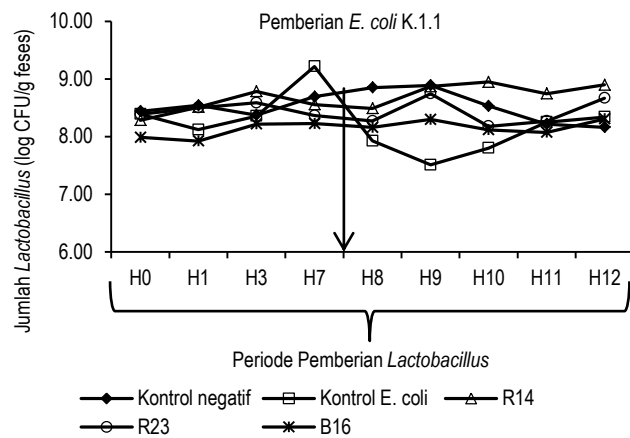
mengalami kenaikan kembali hingga H12 dimana tikus telah sembuh dari diare (Gambar 3 dan Tabel 4). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *E. coli* 10^8 CFU pada tikus menyebabkan terjadinya gangguan keseimbangan mikrobiota usus ditandai dengan penurunan jumlah *Lactobacillus* karena terjadinya kompetisi dalam kolonisasi sel epitel usus pada tikus yang tidak diberi asupan *L. rhamnosus*.



Gambar 2. Jumlah *E. coli* pada feses tikus pada kelompok kontrol negatif, kontrol *E. coli*, dan kelompok tikus yang diberi *L. rhamnosus* R14, *L. rhamnosus* R23, dan *L. rhamnosus* B16

Jumlah *Lactobacillus* pada kelompok tikus yang diberi asupan *L. rhamnosus* cenderung stabil selama periode pengujian (Gambar 3). Sehari setelah pemberian *E. coli* K1.1 (H8) tidak terjadi penurunan jumlah *Lactobacillus* pada feses kelompok tikus yang diberi *L. rhamnosus* (Tabel 4). Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian *L. rhamnosus* mampu mempertahankan jumlah *Lactobacillus* dalam saluran pencernaan walaupun dilakukan pemberian *E. coli* K1.1. Walaupun terjadi diare pada kelompok tikus yang diberi *L. rhamnosus* R14 dan *L. rhamnosus* B16, tetapi tidak parah. Probiotik dapat mencegah infeksi bakteri enterik dengan berkompetisi dengan patogen untuk berikatan dengan sel epitel dan meningkatkan respon imun, baik spesifik maupun non-spesifik (Reid *et al.*, 2003; Zanini *et al.*, 2007; Allen *et al.*, 2010). Selain itu, proteksi dari probiotik dalam menghambat bakteri patogen karena probiotik

menciptakan lingkungan yang tidak sesuai bagi bakteri patogen dan berkompetisi terhadap substrat (Olivares et al., 2006).

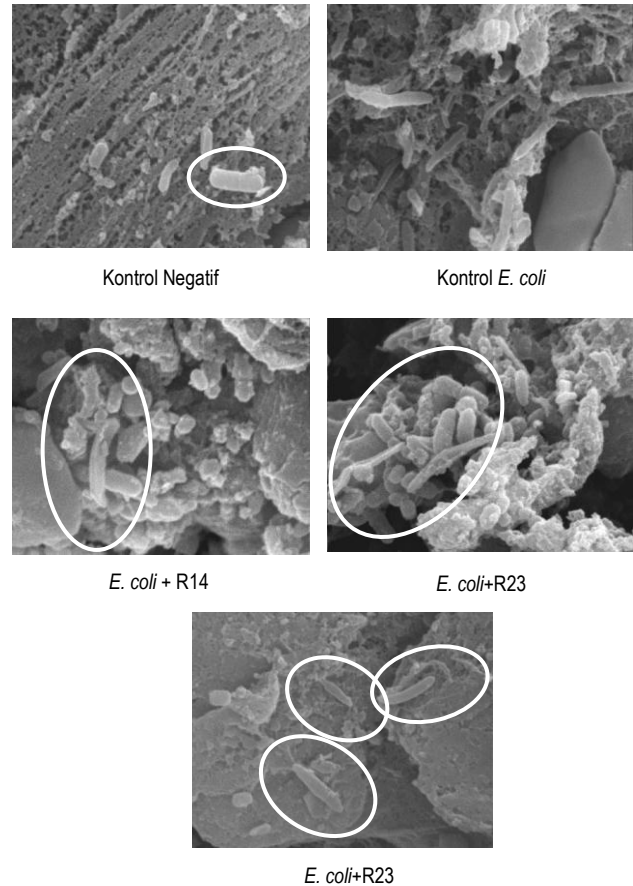


Gambar 3. Jumlah *Lactobacillus* pada feses tikus pada kelompok kontrol negatif, kontrol *E. coli*, dan kelompok tikus yang diberi *L. rhamnosus* R14, *L. rhamnosus* R23, dan *L. rhamnosus* B16

Jumlah *E. coli* dan *Lactobacillus* pada sekum, kolon dan feses tikus setelah penyembuhan diare

Jumlah *E. coli* pada sekum, kolon, dan feses setelah tikus melalui masa penyembuhan diare, hampir sama untuk semua perlakuan, yaitu pada sekum antara 7,31-7,94 log CFU/g, pada kolon 7,45-7,72 log CFU/g dan pada feses 7,07-7,90 log CFU/g. Hal yang sama pada jumlah *Lactobacillus* dalam sekum, kolon dan feses, setelah tikus sembuh dari diare juga tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P>0,05$) antar perlakuan. Setelah tikus sembuh dari diare jumlah *Lactobacillus* pada sekum pada kisaran 8,40-8,64 log CFU/g, pada kolon 8,16-8,56 log CFU/g dan pada feses 8,16-8,90 log CFU/g. Namun demikian, feses kelompok tikus yang diberi *L. rhamnosus* R14 dan *L. rhamnosus* R23 mengandung *Lactobacillus* yang sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol, yaitu 8,9 log CFU/g untuk *L. rhamnosus* R14 dan 8,67 log CFU/g untuk *L. rhamnosus* R23 dibandingkan dengan kontrol negatif sebesar 8,16 log CFU/g dan kontrol *E. coli* sebesar 8,34 log CFU/g feses. Sebaliknya, kandungan *E. coli* lebih rendah dari pada kontrol yaitu 7,35 log CFU/g untuk kelompok *L. rhamnosus* R14 dan 7,12 log CFU/g untuk kelompok *L. rhamnosus* R23 dibandingkan dengan kontrol negatif sebesar 7,90 log CFU/g dan kontrol *E. coli* sebesar 7,78 log CFU/g feses.

Hasil pengamatan permukaan kolon tikus setelah diterminasi disajikan pada Gambar 4. Pada permukaan kolon tikus yang diberi *L. rhamnosus* R23 dan R14, tampak cukup banyak bakteri batang pendek yang diduga *Lactobacillus*, sementara pada kelompok tikus yang hanya diberi *E. coli* didominasi oleh bakteri batang panjang. Berdasarkan pengamatan dengan menggunakan mikroskop, morfologi *Lactobacillus* berupa batang pendek.



Keterangan : Bagian gambar yang berada dalam lingkaran putih merupakan bakteri yang diduga sebagai *Lactobacillus*. R14: *L. rhamnosus* R14, R23: *L. rhamnosus* R23, B16: *L. rhamnosus* B16

Gambar 4. Kondisi mikrobiota kolon tikus pada akhir masa pengujian aktivitas antidiare dengan *caning Electron Microscope Model -JSM 5310 LV* menggunakan perbesaran 10000x

KESIMPULAN

Lactobacillus rhamnosus R14, *L. rhamnosus* R23, dan *L. rhamnosus* B16 asal ASI menunjukkan aktivitas antimikroba yang baik terhadap *E. coli* enteropatogenik K1.1. Pemberian ketiga isolat *Lactobacillus* secara reguler berpotensi untuk mencegah terjadinya diare karena infeksi *E. coli* K1.1. Dari ketiga isolat *Lactobacillus* tersebut *L. rhamnosus* R23 memiliki potensi terbaik untuk mencegah diare dibandingkan kedua isolat *L. rhamnosus* lainnya. *L. rhamnosus* R23 juga mampu menekan jumlah *E. coli* pada feses segera setelah tikus diberi asupan *E. coli* K1.1. Ketika tikus sudah mengalami masa penyembuhan dari diare, jumlah *E. coli* dan *Lactobacillus* pada kelompok tikus yang diberi asupan *L. rhamnosus* maupun kontrol, tidak berbeda nyata.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada pihak Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini melalui program Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch II Tahun Anggaran 2009. Penulis juga menyampaikan terimakasih

kepada Dr. dr. Sri Budiarti dari Laboratorium Bioteknologi Hewan dan Biomedis Pusat Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi LPPM IPB, yang telah memberikan koleksi isolat *E. coli* enteropatogenik strain K1.1 sebagai bakteri uji pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [AIN] American Institute of Nutrition. 1977. Report of the American Institute of nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107: 1340-1348.
- Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF. 2010. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 11. Art. No.CD003048. DOI: [10.1002/14651858.CD003048.pub3](https://doi.org/10.1002/14651858.CD003048.pub3).
- Astawan M, Wresdiyati T, Arief II, Febiyanti D. 2011. Potensi bakteri asam laktat probiotik indigenus sebagai anti-diare dan imunomodulator. *J Teknol dan Industri Pangan* 22: 11-16.
- Budiarti S, Mubarak NR. 2007. Extracellular protease activity of enteropathogenic *Escherichia coli* on mucin substrate. *Hayati J Biosciences* 14: 36-38.
- De Vrese M, Marteau PR. 2007. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *J Nutr* 137: 803S-811S.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. Profil Kesehatan Indonesia 2007. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, Indonesia.
- [FAO/WHO] Food and Agricultural Organization/World Health Organization. 2002. Guidelines for The Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Kanada.
- Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. 2007. Breast milk: A source of Bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonat* 92: 64-66. DOI: [10.1159/000100088](https://doi.org/10.1159/000100088).
- Hartanti WH. 2010. Evaluasi Aktivitas Antidiare Isolat *Lactobacillus* dari Air Susu Ibu. [Tesis]. Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Heyman M, Menard S. 2002. Probiotic microorganism: how they affect intestinal pathophysiology. *Cell Mol Life Sci* 59: 1-15. DOI: [10.1007/s00018-002-8494-7](https://doi.org/10.1007/s00018-002-8494-7).
- Ishida-Fuji K, Sato R, Goto S, Yang XP, Kuboki H, Hirano SI, Sato M. 2007. Prevention of pathogenic *Escherichia coli* infection in mice and stimulation of macrophage activation in rats by an oral administration of probiotic *Lactobacillus casei* I-5. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 866-873. DOI: [10.1271/bbb.60464](https://doi.org/10.1271/bbb.60464).
- Lewis SJ, Heaton KW. 1997. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol* 32: 920-924. DOI: [10.3109/00365529709011203](https://doi.org/10.3109/00365529709011203).
- Mandomando IM, Macte EV, Sanz S, Abacassamo F, Valles X, Sacarlal J, Navia MM, Alonso P, Gascon J. 2007. Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg* 76: 522-527.
- Martin R, Olivares M, Marin LM, Fernandez L. 2005. Probiotic potential of 3 *Lactobacilli* Strains Isolated from Breast Milk, *J of Hum Lactat* 21: 18-17. DOI: [10.1177/0890334404272393](https://doi.org/10.1177/0890334404272393).
- Michail S, Abernathy F. 2002. *Lactobacillus plantarum* reduces the in vitro secretory response of intestinal epithelial cells to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35: 350-5. DOI: [10.1097/00005176-200209000-00021](https://doi.org/10.1097/00005176-200209000-00021).
- Michail S, Abernathy F. 2003. *Lactobacillus plantarum* inhibits the intestinal epithelial migration of neutrophils induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 36: 385-391. DOI: [10.1097/00005176-200302000-00018](https://doi.org/10.1097/00005176-200302000-00018).
- Nguyen RN, Taylor LS, Tauschek M, Robins-Browne RM. 2006. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg Infect Dis* 12: 597-603. DOI: [10.3201/eid1204.051112](https://doi.org/10.3201/eid1204.051112).
- Olivares M, Diaz-Ropero MP, Martin R, Rodriguez JM, Xaus J. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol* 101: 72-79. DOI: [10.1111/j.1365-2672.2006.02981.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02981.x).
- Oyetayo VO, Adetuyi FC, Akinyosoye FA. 2003. Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo. *Afr J of Biotechnol* 2: 448-452.
- Oyetayo VO. 2004. Performance of rats orogastrically dosed with faecal strains of *Lactobacillus acidophilus* and challenged with *Escherichia coli*. *Afr J of Biotechnol* 3: 409-411.
- Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. 2003. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clinical Microbiol. Rev* 16: 658-672. DOI: [10.1128/CMR.16.4.658-672.2003](https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.658-672.2003).
- Sherman PM, Johnson-Herry KC, Yeung HP, Ngo PSC, Goulet J, Tompkins TA. 2005. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infection and Immunity* 73: 5183-5188. DOI: [10.1128/IAI.73.8.5183-5188.2005](https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.5183-5188.2005).
- Yatsuyanagi J, Saito S, Miyajima Y, Amano, K, Enomoto, E. 2003. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. *J Clinical Microbiol* 41: 2033-2039. DOI: [10.1128/JCM.41.5.2033-2039.2003](https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2033-2039.2003).
- Zanini K, Marzotto M, Castellazzi A, Borsari A, Dellaglio F, Torriani S. 2007. The effects of fermented milks with simple and complex probiotic mixtures on the intestinal microbiota and immune response of healthy adults and children. *Int Dairy J* 17: 1332-1343. DOI: [10.1016/j.idairyj.2007.01.017](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.017).
- Zhang W, Azevedo MSP, Gonzalez AM, Saif LJ, Nguyen TV, Wen K, Yousef AE, Lijuan Yuan L. 2008. Influence of probiotic *Lactobacilli* colonization on neonatal B cell responses in a gnotobiotic pig model of human rotavirus infection and disease. *Vet Immunol Immunopathol* 122: 175-181. DOI: [10.1016/j.vetimm.2007.10.003](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.10.003).