

Karakterisasi Isolat Khamir Gf1 terhadap Kondisi Asam Saluran Pencernaan Unggas

Awwaluz Zahroh Mahya Ainillah^{1*}, Nuraeni Ekowati¹, Ade Erma Suryani²

¹Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman

²BPTBA LIPI Gunung Kidul, Yogyakarta, 55861, Indonesia

*email : awwaluzzahroh22@gmail.com

Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 26/08/2019

Disetujui : 31/01/2020

Abstract

Probiotics are microorganism which can improve intestinal microecology and give positive impact on host health. Probiotic candidates are microorganism which potential to used as probiotic, such as potential to producing phytase enzyme to optimize gastrointestinal tract. One of microorganism as probiotic candidates is yeast producing phytase. Yeast producing phytase has been isolated by BPTBA-LIPI Yogyakarta from Indonesian traditional fermented food such as *gathot*. Characterization of probiotic candidates is done by stimulate gastrointestinal tract condition, include acid condition such as low pH and gastric acid. Condition of low pH and gastric acid are inhibitor microorganism entered to gastrointestinal tract. However, acid tolerance test are used to understand the potential probiotic characteristic of microorganism. Testing is done by invitro by regulating the resistance of yeast under acidic conditions with pH values 2 and 3, and gastric acid conditions using pepsin 0.3%. The result of this study are yeast producing phytase GF1 isolated from Indonesian traditional fermented food are tolerance of acid condition because it can viable on pH 3 and gastric acid condition.

Key Words : Acid, Yeast, Viability

Abstrak

Probiotik merupakan mikroorganisme yang dapat memperbaiki mikroekologi usus yang berdampak positif terhadap kesehatan inang. Kandidat probiotik merupakan mikroorganisme yang memiliki potensi sebagai probiotik, seperti menghasilkan enzim fitase sehingga mampu mengoptimalkan kondisi saluran pencernaan. Salah satu mikroorganisme sebagai kandidat probiotik adalah khamir penghasil enzim fitase. Khamir penghasil fitase telah diisolasi oleh BPTBA-LIPI Yogyakarta asal makanan fermentasi tradisional Indonesia yaitu *gathot*. Pengujian khamir fitase sebagai kandidat probiotik dilakukan dengan menstimulasikan kondisi saluran pencernaan seperti kondisi asam yaitu pada pH rendah dan kondisi asam lambung. Kondisi pH yang rendah dan asam lambung merupakan suatu penghalang masuknya mikroorganisme ke saluran gastrointestinal, oleh karena itu pengujian terhadap asam dilakukan untuk mengetahui karakteristik mikroorganisme yang akan digunakan sebagai kandidat probiotik. Pengujian dilakukan secara invitro dengan menguji ketahanan khamir pada kondisi asam dengan nilai pH 2 dan 3 serta kondisi asam lambung dengan menggunakan pepsin 0,3%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat khamir GF1 asal makanan tradisional fermentasi mampu tahan terhadap kondisi asam karena mampu mempertahankan viabilitasnya pada pH 3 dan kondisi asam lambung.

Kata kunci : Asam, Khamir, Viabilitas

PENDAHULUAN

Mikroorganisme probiotik memiliki karakteristik toleran terhadap kondisi asam, garam empedu, asam lambung; berpotensi sebagai antimikroba pada saluran pencernaan; serta tahan terhadap antibiotik. Pengujian khamir fitase sebagai kandidat probiotik dilakukan dengan menstimulasikan kondisi saluran pencernaan seperti pH rendah, kondisi asam lambung, dan garam empedu. Kondisi pH rendah (2,5-3,5) merupakan penghalang masuknya strain mikroorganisme probiotik ke saluran usus (Damayanti *et al.*, 2014). Khamir yang bersumber dari makanan fermentasi memiliki sifat toleransi terhadap lingkungan asam.

Menurut Syal & Vohra (2013), hasil isolasi khamir pada makanan fermentasi seperti roti India memiliki viabilitas 56 hingga 100% dalam HCl dengan nilai pH 2. Berdasarkan Fadda *et al.* (2017), beberapa strain khamir *Kluyveromyces* yang diisolasi dari keju mampu hidup pada pH 2, sedangkan semua strain uji *Kluyveromyces* mampu hidup pada kondisi lambung di pH 3. Kedua strain yang diuji menunjukkan tingkat kelangsungan hidup hingga 100%. Khamir yang diisolasi dari feses dan kefir dicirikan toleran pada asam, yaitu memiliki viabilitas 86-97% ketika terpapar pH 2,5 dan viabilitas 85-92% pada pH 1,5 (Lara-Hidalgo *et al.*, 2017). Hambatan khamir sebagai probiotik pada

tubuh terjadi pada lambung karena adanya asam lambung. Asam lambung dapat membunuh mikroorganisme dengan mekanisme pH asam dan enzim. Asam lambung disekresikan oleh proventrikulus pada pH sekitar 2 (Duke, 1986). Menurut Chen *et al.* (2010), untuk mendapatkan kondisi asam lambung pada gastrointestinal dapat digunakan 0,3% pepsin. Menurut Ogunremi *et al.* (2015), strain khamir hasil isolasi dari makanan tradisional fermentasi di Nigeria yaitu *Pichia kluyveri* LKC17, *Issatchenkia orientalis* OSL11, *Pichia kudriavzevii* OG32, *P. kudriavzevii* ROM 11 yang distimulasikan pada kondisi asam lambung (0,3% pepsin, pH 2) memiliki viabilitas hingga 100%.

Eksplorasi mikroorganisme sebagai kandidat probiotik unggas asal makanan tradisional khususnya khamir telah dilakukan oleh Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (BPTBA-LIPI) Yogyakarta. Karakterisasi mikroorganisme sebagai kandidat probiotik dilakukan karena memiliki potensi menghasilkan enzim yang dapat meningkatkan pencernaan unggas yaitu enzim fitase. Eksplorasi khamir penghasil fitase telah diperoleh dari beberapa makanan tradisional antara lain tempe kedelai, tempe gembus, tempe koro, dan *gathot*. Hasil eksplorasi diperoleh isolat khamir dari *gathot* (GF1) memiliki aktivitas enzim fitase. *Gathot* merupakan makanan tradisional khas Gunung Kidul, Yogyakarta yang terbuat dari singkong yang difermentasi. *Gathot* dibuat dengan mengeringkan singkong yang telah dikupas kemudian di rendam air untuk mendapatkan warna hitam khas *gathot* (Oktaviana, 2014). Isolat khamir asal *gathot* (GF1) dipilih dan dilakukan pengujian terhadap ketahanan asam (sesuai pH didalam proventriculus) dan pengujian terhadap asam lambung guna memberikan sebagian informasi karakteristik isolat khamir untuk dapat digunakan sebagai kandidat probiotik pada unggas. Pengujian karakterisasi isolat dapat dilakukan pada kondisi asam (pH 2 dan 3) dan uji asam lambung. Berdasarkan uraian tersebut, maka tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui apakah isolat khamir GF1 asal makanan tradisional terfermentasi memiliki ketahanan terhadap asam saluran pencernaan unggas.

MATERI DAN METODE

Materi yang digunakan pada penelitian ini antara lain *autoclave* (TOMY SX-700), vortex mixer (VM-300), mikropipet Eppendorf, *Laminar Air Flow* (JSCB-1200SB), pH meter (Bench 700 series), sentrifugator (Selecta Centrifriger BL-II),

inkubator 30°C (Mermert), inkubator 37°C (Binder), timbangan analitik (KERN), isolat khamir penghasil fitase asal makanan asal *gathot* (GF1), medium *Yeast Glucose Choramphenicol Broth* (YGCB), medium *Yeast Glucose Choramphenicol Agar* (YGCA), *millipore* 0,45µm (Corning), *syringe*, NaCl fisiologis (0,85%), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), HCl, dan pepsin 0,3%

Uji ketahanan khamir terhadap pH2 dan pH 3

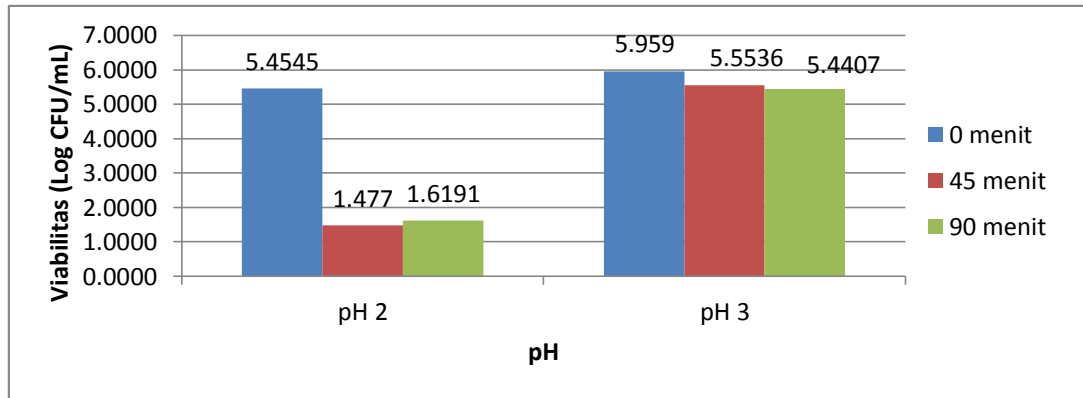
Uji ketahanan khamir terhadap pH2 dan pH 3 dilakukan berdasarkan metode Damayanti *et al.* (2014) yang dimodifikasi. Isolat khamir dalam medium YGCB berumur 24 jam disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm dengan suhu 4°C selama 10 menit. Pelet hasil sentrifugasi dibersihkan dari media menggunakan PBS sebanyak 2 kali. Pelet ditambahkan PBS steril dan dihomogenkan. Suspensi pelet ditambahkan masing-masing ke PBS steril pH 2 dan pH 3, kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 30°C. Sampel diambil pada waktu inkubasi 0 jam, 45 menit, dan 90 menit, kemudian dilakukan pengenceran berseri dilanjutkan dengan inokulasi pada medium YGCA. Hasil inokulasi diinkubasi pada 30°C selama 48 jam. Viabilitas diamati berdasarkan hasil *Total Plate Count* (TPC) pada medium.

Uji ketahanan khamir terhadap asam lambung

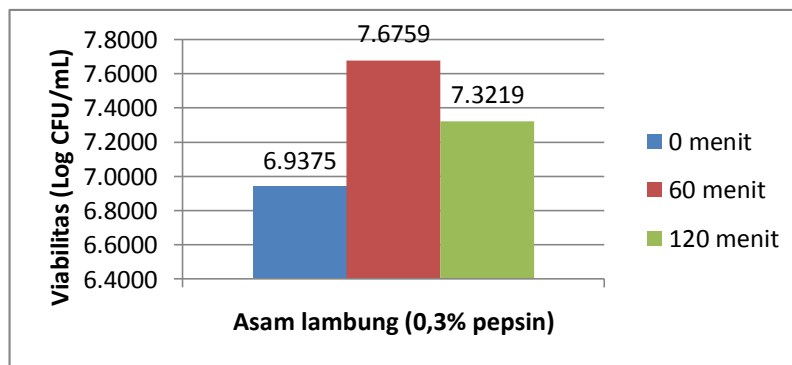
Uji ketahanan khamir terhadap asam lambung dilakukan berdasarkan metode Damayanti *et al.* (2014) yang dimodifikasi. Isolat khamir dalam medium YGCB berumur 24 jam disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm dengan suhu 4°C selama 10 menit. Pelet hasil sentrifugasi dibersihkan dari media menggunakan PBS sebanyak 2 kali. Pelet dilarutkan dalam PBS steril kemudian dihomogenkan. Pelet yang dilarutkan ditambahkan PBS pH asam yang mengandung 0,3% pepsin, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C. Sampel diambil pada waktu inkubasi 0 menit, 60 menit, dan 120 menit kemudian dilakukan pengenceran berseri dan inokulasi ke medium YGCA. Hasil inokulasi diinkubasi pada 30°C selama 48 jam. Viabilitas diamati berdasarkan hasil TPC pada medium.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ketahanan isolat khamir GF1 terhadap kondisi asam dilakukan dengan menghitung viabilitas isolat khamir terhadap paparan kondisi asam meliputi kondisi pH 2, pH 3 dan kondisi asam lambung. Hasilnya ditunjukkan pada diagram berikut (Gambar 1 dan Gambar 2).



Gambar 1. Viabilitas khamir GF1 terhadap pH 2 dan pH 3



Gambar 2. Viabilitas khamir GF1 terhadap kondisi asam lambung

Berdasarkan Gambar 1, isolat khamir GF1 memiliki viabilitas lebih tinggi pada pH 3 dibandingkan dengan pH 2. Isolat khamir GF1 memiliki penurunan viabilitas pada pH 2 dan pH 3 seiring lamanya waktu inkubasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat khamir GF1 memiliki ketahanan lebih baik pada pH 3. Berdasarkan penelitian Hu *et al.* (2018), terdapat khamir yang mampu mempertahankan viabilitasnya pada pH rendah yaitu pH 2 dan pH 3 seperti pada *Saccharomyces cereviceae*. Menurut Rajkowska & Kunicka-Styczynska (2010), nilai pH menentukan kemampuan pertumbuhan khamir yang tahan terhadap pH menuju ke saluran gastrointestinal. Berdasarkan penelitian Chen *et al.* (2010), nilai pH dapat mempengaruhi viabilitas isolat khamir. Khamir tahan uji terhadap pH 3 lebih banyak dibandingkan dengan pH 2. Beberapa khamir yang tahan pada pH 2 yaitu *Pichia kudriavzevii* BY10, *Yarrowia lipolytica* HJ6 dan *Y. lipolytica* HY15. Menurut Ogunremi *et al.* (2015), khamir yang mampu tumbuh pada kondisi asam dipengaruhi waktu inkubasi yang digunakan. Khamir yang tahan terhadap asam antara lain *Pichia kluyveri* LKC17, *Issatchenkia orientalis* OSL11, *Pichia kudriavzevii* OG32, dan *Candida tropicalis* BOM21 pada pH 3 waktu inkubasi 3 jam, sedangkan khamir yang mampu tumbuh pada pH 2 yaitu *Pichia kudriavzevii* ROM11, *Pichia kluyveri* LKC17, dan

Pichia kudriavzevii OG32, *Issatchenkia orientalis* OSL11, *Pichia kudriavzevii* dan *Candida tropicalis* BOM21

Berdasarkan Gambar 2, menunjukkan bahwa isolat khamir GF1 memiliki viabilitas tertinggi pada waktu inkubasi 60 menit dan menunjukkan penurunan viabilitas pada menit ke-120. Hal tersebut menunjukkan bahwa waktu inkubasi dan enzim yang ditambahkan dapat mempengaruhi viabilitas isolat khamir terhadap suasana asam. Menurut Fietto *et al.* (2004), *Saccharomyces boulardii* mampu mempertahankan viabilitas dalam lingkungan lambung. Menurut Kumura *et al.* (2004), resistensi khamir terhadap pepsin berkaitan dengan kemampuan adhesi dan ekspresi protein pada khamir. Menurut Moradi *et al.* (2018), khamir yang resisten terhadap pepsin menunjukkan khamir tersebut memiliki aktivitas proteolitik, misalnya khamir *Kluyveromyces* yang mampu tahan terhadap pepsin yaitu pada strain *Kluyveromyces* S97 dan S106.

Nilai pH rendah berhubungan dengan konsentrasi HCl di saluran pencernaan (Psomas *et al.*, 2001). Lambung merupakan tempat sekresi asam klorida (HCl). HCl lambung berfungsi sebagai pertahanan utama terhadap patogen yang dapat

tertelan bersama makanan atau air. HCl lambung meningkatkan penyerapan kalsium dan zat besi makanan serta mengaktifkan enzim yaitu pepsinogen menjadi pepsin. Enzim tersebut terlibat dalam hidrolisis protein (Smith, 2003). Pepsin merupakan enzim proteolitik dalam asam lambung. Residu asam yang dihasilkan pepsin berperan dalam proteolisis substrat dengan mekanisme katalisis basa. Enzim pepsin dapat aktif pada pH asam serta menunjukkan aktivitas katalitik tertinggi pada pH 2.0 (Niu *et al.*, 2016).

Mekanisme penghambatan tersebut berkaitan dengan aktivitas enzim dan pH rendah (Ouweland *et al.*, 1999). Nilai pH rendah dalam lambung berkaitan dengan konsentrasi asam klorida HCl (Khidhr & Zubaidy, 2014). Toleransi asam lambung dari strain mikroorganisme dikaitkan dengan keberadaan transporter resistensi asam yang mempertahankan gradien pH konstan antara cairan ekstraseluler dan sitoplasma sel mikroba (Illegheims *et al.*, 2013). Menurut Sorrels & Leonard (1988), ketahanan strain khamir terhadap suasana asam dipengaruhi oleh keterlibatan dinding sel khamir dalam mekanisme transport. Struktur dinding sel mempengaruhi transport aktif dan kebutuhan energi khamir. Penghambatan pada suasana asam meningkatkan kebutuhan energi untuk pompa asam. Penurunan tingkat pertumbuhan khamir dalam medium asam menunjukkan permintaan energi untuk transport yang besar. Menurut Brandao *et al.* (2014), Sebagian besar sel akan mempertahankan gradien konsentrasi H^+ ekstraseluler terhadap intraseluler di plasma membran. Faktor stress asam dapat mempengaruhi gradien konsentrasi H^+ yang melintasi membran plasma. Toleransi khamir pada asam bergantung pada aktivitas ATPase setelah terpapar asam. Aktivitas ATPase mempengaruhi ekspresi sistem transport sekunder pada membran plasma.

SIMPULAN

Isolat khamir GF1 memiliki ketahanan terhadap pH rendah yaitu pada kondisi pH 3 serta pada kondisi asam lambung dalam waktu inkubasi 90 menit, sedangkan pada kondisi pH 2, khamir mengalami penurunan viabilitas setelah waktu inkubasi 45 menit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada BPTBA-LIPI Yogyakarta yang telah mengizinkan penulis melakukan penelitian dengan sumber dana Penelitian Tematik BPTBA-LIPI Tahun 2018.

DAFTAR REFERENSI

Damayanti, E., Julendra, H., Sofyan, A., & Hayati, S. N. 2014. Bile salt and acid tolerant of lactic acid bacteria isolated from

proventriculus of broiler chicken. *Media Peternakan*, 37(2), pp. 80-86.

Duke, G. E. 1986. *Alimentary canal: Anatomy, regulation of feeding, and motility*. Pages 269–288 in *Avian Physiology*. P. D. New York: Sturkie, ed. Springer-Verlag.

Fadda, M. E., Mossa, V., Deplano, M., Pisano, M. B., & Cosentino, S. 2017. In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. *LWT-Food Science and Technology*, 75, pp. 100-106.

Fietto, J. L. R., Araujo, R. S., Valadao, F.N., Fietto, L.G., Brandao, R.L., Neves, M. J., Gomes, F. C. O., Nicoli, J. R. and Castro, I. M. 2004. Molecular and physiological comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, pp. 615-621.

Hu, X. Q., Liu, Q., Hu, J. P., Zhou, J. J., Zhang, X., Peng, S. Y., & Wang, X. D. 2018. Identification and characterization of probiotic yeast isolated from digestive tract of ducks. *Poultry science*, 97(8), pp. 2902-2908.

Illegheims, K., De Vuyst, L. & Weckx, S. 2013. Complete genome sequence and comparative analysis of *Acetobacter pasteurianus* 386B, a strain well-adapted to the cocoa bean fermentation ecosystem. *BMC Genomics*, 14, pp. 526.

Khidhr, K. O., & Zubaidy, Z. M. A. 2014. Isolation and Identification of *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii* and its Uses as a Probiotic (in vitro). *Rafidain journal of science*, 25(1E), pp. 1-11.

Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T., & Shimazaki, K. 2004. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of dairy science*, 87(12), pp. 4050-4056.

Lara-Hidalgo, C., Hernández-Sánchez, H., Hernández-Rodríguez, C., & Dorantes-Álvarez, L. 2017. Yeasts in Fermented Foods and their Probiotic Potential. *Austin Journal of Nutrition & Metabolism*, 4(1045), pp. 1-8.

Moradi, R., Nosrati, R., Zare, H., Tahmasebi, T., Saderi, H., & Owlia, P. 2018. Screening and characterization of in-vitro probiotic criteria of *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* strains. *Iranian Journal of Microbiology*, 10(2), pp. 121-131.

Niu, C., Luo, H., Shi, P., Huang, H., Wang, Y., Yang, P., & Yao, B. 2016. N-Glycosylation Improves the Pepsin Resistance of Histidine

- Acid Phosphatase Phytases by Enhancing Their Stability at Acidic pHs and Reducing Pepsin's Accessibility to Its Cleavage Sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), pp. 1004-1014.
- Ogunremi, O. R., Sanni, A. I., & Agrawal, R. 2015. Probiotic potentials of khamirs isolated from some cereal based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of applied microbiology*, 119(3), pp. 797-808.
- Oktaviana, R. S. 2014. Pengaruh Substitusi Puree Gatot Instan Terhadap Sifat Organoleptik Roti Manis. *Jurnal Tata Boga*, 3(3), pp. 141-150
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., & Salminen, S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 9, pp. 43-52.
- Psomas, E.I., Andrighetto, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Lombardi, A. and Tzanetakis, N. 2001. Some probiotic properties of yeasts isolates from infant faeces and feta cheeses. *International Journal Food Microbiology*, 69, pp. 125-133.
- Rajkowska, K., & Kunicka-Styczynska, A. 2010. Probiotic properties of yeasts isolated from chicken feces and kefir. *Pol J Microbiol*, 59(4), pp. 257-263.
- Smith, J. L. 2003. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *Journal of food protection*, 66(7), pp. 1292-1303.
- Sorrells, K. M., & Leonard, B. 1988. Mechanism of acid tolerance by a yeast isolated from spoiled ketchup. *Journal of Food Protection*, 51(6), pp. 489-490.
- Syal, P & Vohra, A. 2013. Probiotic Potential of Yeasts Isolated From Traditional Indian Fermented Foods. *International Journal of Microbiology Research*, 5, pp. 390-398