

KEANEKARAGAMAN BAKTERI PENGHASIL EKSOPOLISAKARIDA ASAL SALURAN CERNA MANUSIA

Achmad Dinoto*, Sugiyono Saputra, Agustinus Joko Nugroho dan Rita Dwi Rahayu

Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).

Jl. Raya Jakarta-Bogor Km. 46 Cibinong 16911 Indonesia. Telp. +62-21-8765066 Fax. +62-21-8765062.

*E-mail: achmaddinoto@yahoo.com

ABSTRACT

Exopolysaccharide (EPS) is a polysaccharide that is excreted by cell as metabolites. Bacterial EPS has been widely used in food and drug industries. In order to find natural products for foods and drugs, the study was conducted to know the diversity of EPS-producing bacteria isolated from human gastrointestinal tracts. As much of 30 bacterial strains were collected from two healthy people and seventeen of collected isolates were investigated for the capability of producing EPS. As the results of identification by partial 16S ribosomal DNA analysis, those seventeen EPS-producing bacterial strains were closely related with already known bacteria (range between 86 to 100% similarity) and could be classified into seven genus, i.e.: Lactobacillus spp. (9 strains), Enterobacter sp. (2 strains), Escherichia sp. (2 strains), Klebsiella sp. (1 strain), Cronobacter sp. (1 strain), Staphylococcus sp. (1 strain), and Alteromonas sp. (1 strain). In addition, member of Lactobacillus group which have closest relationship with species L. plantarum (7 strains) dan L. fermentum (2 strains) were known to dominate the collection of culturable EPS-producing bacteria from human gastrointestinal tracts.

Key words: Exopolysaccharide (EPS), bacteria, human gastrointestinal tract, 16S rDNA analysis

PENGANTAR

Jumlah sel mikrobiota yang tinggal di dalam saluran cerna manusia 10 kali lebih banyak dibandingkan jumlah sel tubuh manusia itu sendiri (Backhed *et al.*, 2005) dan kumpulan genom mikrobiota (mikrobiom) dapat mencapai 100 kali lebih banyak dari gen-gen yang ada pada gen manusia (Gill *et al.*, 2006). Beberapa kelompok bakteri asal saluran cerna manusia telah dilaporkan mampu menghasilkan eksopolisakarida (EPS), seperti bifidobacteria dan lactobacilli (Ruas-Madiedo *et al.*, 2007).

EPS adalah polisakarida yang diekskresikan oleh sel sebagai produk metabolisme. EPS banyak dimanfaatkan dalam industri pangan dan obat-obatan. Ada banyak jenis senyawa EPS yang dapat digolongkan menjadi homopolisakarida dan heteropolisakarida (Badel *et al.*, 2010). Senyawa homopolisakarida tersusun atas monosakarida yang seragam meliputi kelompok fruktan (inulin dan levan) dan kelompok glukon (mutan, reuteran dan dekstran) (Badel *et al.*, 2010). Dekstran merupakan salah satu senyawa polisakarida yang banyak digunakan dalam industri obat-obatan. Salah satu aplikasi pemanfaatan senyawa dekstran adalah digunakan sebagai bahan pengantar obat (*drug delivery system*) yang penting dalam pembuatan insulin oral (Sabetsky, 2004).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keanekaragaman bakteri penghasil EPS asal saluran cerna manusia. Hasil penelitian ini akan membuka landasan

dasar eksplorasi bakteri saluran cerna sebagai agen hayati untuk sintesis senyawa polimer berbasis polisakarida dalam penyediaan bahan farmasetikal.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel. Sampel feses diperoleh dari dua orang dewasa (pria 25 tahun dan wanita 28 tahun) dalam kondisi sehat dan tidak mengkonsumsi obat-obatan selama kurang lebih tiga bulan sebelum pengambilan sampel dilakukan. Sampel feses ketika diisolasi dalam keadaan segar, tidak melebihi dua jam setelah proses defekasi.

Isolasi dan Purifikasi. Isolasi dilakukan dengan dua metode, yaitu metode isolasi langsung dan pengayaan (*enrichment*).

1) Metode isolasi langsung. Metode isolasi ini dilakukan dengan menggunakan medium *Glucose Yeast Extract Peptone Agar* (GYP) dengan komposisi glukosa (Merck, Schuchardt, Germany) 20,0 g; agar (Aneka Sarana Lab, Bogor) 20,0 g; pepton (Difco Laboratories, Detroit, USA) 10,0 g; *yeast extract* (Difco Laboratories, Detroit, USA) 1,0 g; K₂HPO₄ (Merck, Schuchardt, Germany) 0,5 g; MgSO₄·7H₂O (Merck, Schuchardt, Germany) 0,5 g; CaCO₃ (Merck, Schuchardt, Germany) 1,0 g; FeSO₄·7H₂O (Merck, Schuchardt, Germany) 0,05g dan *Lactobacilli MRS Agar* (*Lactobacilli de Man-Rogosa-Sharpe Agar*) –modifikasi dengan komposisi per liter, yaitu sumber karbon 20,0 g; agar 20,0 g; pepton (Difco Laboratories,

Detroit, USA) 10,0 g; *beef extract* (Difco Laboratories, Detroit, USA) 10 g; $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Germany) 5,0 g; *yeast extract* (Difco Laboratories, Detroit, USA) 5,0 g; ammonium citrate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 2,0 g; Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, Germany) 2,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Germany) 0,575 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (JT Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ) 0,12 g; Tween 80 (Merck, Schuchardt, Germany), *L-cysteine* (Merck, Darmstadt, Germany) 1% sebanyak 25 mL. Substitusi sumber karbon berupa glukosa dan sukrosa (Merck, Darmstadt, Germany) masing-masing 2%. Sebanyak 0,5 g feses dilarutkan dengan larutan NaCl (Merck, Darmstadt, Germany) 0,85% kemudian divorteks. Setelah homogen, ambil sebanyak 100 μL untuk dibuat seri pengenceran hingga 10^{-6} dengan volume total pengenceran 1 mL. Sebanyak 100 μL larutan diambil dari tingkat pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} untuk disebar ke dalam medium agar cawan secara duplo. Kultur diinkubasikan pada suhu 37° C selama 48 jam secara anaerobik.

2) Metode pengayaan (*enrichment*). Metode isolasi ini menggunakan medium MRS yang dimodifikasi dengan sumber karbon berupa pati sagu 2% (b/v) (MRS-Sagu). Sebanyak 0,5 g feses dimasukkan ke dalam MRS-Sagu dengan volume 5 mL pada tabung ulir, kemudian di vorteks. Setelah homogen, kultur diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam secara anaerobik. Dari kultur cair tersebut, diambil sebanyak 5% atau 250 μL dari tiap tabung ulir untuk diinokulasikan kembali ke medium MRS-Sagu yang baru sebagai pengayaan pertama. Langkah tersebut dilakukan hingga tiga kali pengayaan. Dari kultur pengayaan ke-3, diambil masing-masing 100 mL dari tiap tabung ulir untuk disebar ke dalam medium cawan agar MRS-Sagu melalui metode pengenceran. Sebanyak 100 μL larutan diambil dari tingkat pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} untuk disebar ke dalam medium agar secara duplo. Kultur diinkubasikan pada suhu 37° C selama 48 jam secara anaerobik.

Preparasi Metabolit dalam Pengujian Sintesis EPS. Pre-kultur bakteri asal saluran cerna dibuat dengan menginokulasikan sebanyak satu ose koloni bakteri ke dalam tabung ulir yang berisi 5 mL MRS cair dan diinkubasi selama 18–24 jam pada suhu 37° C secara anaerobik. Sebanyak 1,25 mL kultur semalam tersebut (5%) diinokulasikan ke dalam tabung yang berisi 25 mL medium MRS cair. Kultur diinkubasikan selama 48 jam pada suhu 37° C secara anaerobik. Kultur dipanaskan pada air mendidih (suhu 100° C) selama 20 menit kemudian disentrifuse (Kubota 6500, Tokyo Japan) dengan kecepatan 16000 \times g selama 30 menit. Supernatant diambil dan ditambahkan 75 mL ethanol (Merck, Darmstadt, Germany)

95% dingin (tiga kali lipat dari volume supernatan). EPS dipresipitaskan pada suhu 4° C selama 24 jam, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 16000 \times g selama 20 menit. Supernatan dibuang, pelet dilarutkan 1,5 mL akuades steril untuk dilakukan proses dialisis. Dialisis dilakukan dengan menggunakan *dialysis tubing cellulose membrane* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), MW cutoff > 12000. Pelet eksopolisakarida yang sudah dilarutkan dengan akuades steril dimasukkan ke dalam tubing dan diikat kedua ujungnya dengan tali. Tubing direndam dalam akuades dan disimpan pada suhu 4° C. Akuades diganti dua kali sehari, selama 3 hari. Setelah itu, larutan eksopolisakarida diambil dan dicatat volume akhirnya. Penghitungan kadar EPS dilakukan dengan menghitung.

Pengukuran kadar EPS. Pengukuran kadar EPS dilakukan dengan metode fenol-sulfat. Kurva standar disiapkan dengan cara dengan membuat larutan standar glukosa (Merck, Darmstadt, Germany) 1%. Konsentrasi glukosa yang digunakan adalah 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75 dan 85 μg . Blanko dibuat dalam tabung kaca dengan larutan berikut (dibuat triplikat untuk setiap kali percobaan): 780 μL akuades steril, 20 μL reagen fenol (Merck, Darmstadt, Germany) 5% dan 2 mL asam sulfat (Merck, Darmstadt, Germany). Sampel eksopolisakarida disiapkan dalam tabung kaca dengan larutan berikut (dibuat triplikat untuk setiap sampel berbeda): 20 μL sampel dialisis, 780 μL akuades steril, 40 μL reagen fenol 5% dan 2 mL asam sulfat. Penambahan fenol dan asam sulfat dilakukan secara berurutan untuk satu reaksi (satu tabung reaksi). Reaksi ini kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang A_{490} (UV-Vis spektrofotometer Mini 1240, Shimadzu, Japan). Hasil ditunjukkan dalam mg EPS per liter, dihitung menggunakan rumus menurut *Mozzi et al.*, (2002).

Ekstraksi DNA. Bakteri yang sudah diuji kemampuan menghasilkan EPS-nya ditumbuhkan pada medium MRS-broth selama 24 jam pada suhu 37° C secara anaerobik. Sebanyak 1,5 mL kultur kemudian disentrifuse menggunakan Eppendorf Mini Spin Plus (Hamburg, Germany) dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan pelet sel. DNA diekstraksi menggunakan *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas, Canada). Pelet sel yang sudah didapatkan ditambah 400 μL *lysis solution* dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 65° C. Sebanyak 600 μL chloroform (Merck, Darmstadt, Germany) ditambahkan ke dalam tabung mikrosentrifuga dan dibolak-balik 3–5 kali, kemudian di sentrifus dengan kecepatan 10000 rpm selama 2 menit. Setelah terbentuk tiga lapisan, transfer lapisan paling atas dengan hati-hati ke dalam tabung

mikrosentrifuge yang baru. Sebanyak 800 µL *precipitation solution* ditambahkan dan di bolak-balik selama 1–2 menit kemudian disentrifus kembali kecepatan 10000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang dan pelet DNA yang tertinggal dilarutkan dengan 100 µL NaCl solution. Etanol absolut (Merck, Darmstadt, Germany) kemudian ditambahkan sebanyak 300 µL dan dipresipitasi pada suhu -2°C selama 10 menit, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 10000 rpm selama 4 menit. Presipitasi ini dilakukan kembali menggunakan ethanol 70%. Setelah disentrifus, pelet DNA dibiarkan hingga mengering lalu dapat dilarutkan dengan akuades steril sebanyak 50 µL.

PCR. Identifikasi isolat bakteri dengan analisis 16S rDNA. Tahapan yang dilakukan berupa ekstraksi DNA, optimasi primer dan amplifikasi, amplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), visualisasi hasil PCR, purifikasi DNA hasil amplifikasi, *cycle sequencing*, sekuen dan analisis data. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen 16S rDNA adalah primer 20F (5'-GATTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1500R (5-GTTACCTTGTTACGACTT-3') 10 pmol masing-masing sebesar 0,625 µL, DNA template 5 µL, DMSO 0,5 µL, Go Taq (Promega) sebesar 12,5 µL dan 5,75 µL *deionized water*. Reaksi PCR dengan menggunakan Thermalcycler (Takara Shuzo Co., Ltd., Shiga, Japan) selama 30 siklus. Pemanasan pertama pada suhu 95°C selama 1,5 menit, kemudian dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi 0,5 menit pada suhu 95°C , annealing 0,5 menit pada suhu 50°C dan 1,5 menit ekstensi pada suhu 72°C . Setelah 30 siklus selesai, diikuti 5 menit pada suhu 72°C dan pendinginan pada suhu 4°C selama 20 menit. Hasil amplifikasi di fraksinasi secara elektroforesis menggunakan Mupid Mini Cell (exu) pada gel agarose 1% dalam buffer TAE (Tris Acetat-EDTA) selama 30 menit pada 100 V. Gel hasil elektroforesis direndam dalam larutan ethidium bromida dengan konsentrasi 1 µL/100 mL selama 20 menit. Hasil pemisahan divisualisasi pada *Gel Doc Printgraph* (Bioinstrument, ATTO) menggunakan UV transluminator dengan menggunakan standar 100 bp DNA ladder (Promega) untuk mengetahui hasil dan ukuran pita DNA hasil amplifikasi. Purifikasi produk PCR dilakukan dengan metode presipitasi PEG (Hiraishi *et al.*, 1995). Ke dalam 25 µl sampel produk PCR ditambahkan 15 µl larutan PEG (40% PEG 6000 dan 10 mM MgCl_2) dan 6 µl 3 M sodium asetat. Bolak-balik selama 10 menit dan sentrifugasi dengan kecepatan 16.100 g selama 25 menit. Supernatan dibuang dengan cara dipipet. Pellet DNA dicuci dengan 50 µl etanol 70% sebanyak 2 kali. Dan pellet dilarutkan dengan 20 µl dH_2O *ultra pure*. Sampel 16S rDNA murni disimpan pada -20°C .

Sekuensing. *Cycle sequencing* dilakukan dengan menggunakan primer 20F (5'-GATTTTGATCCTGGCTCAG-3'). Komposisi yang digunakan untuk tiap tabung adalah 0,5 µL primer 10 pmol, 1 µL DNA hasil purifikasi, 0,5 µL *Big Dye Terminator Sequence Premix Kit* (Applied Biosystems Inc., Warrington, UK), 5 kali *sequence bufer* 1,5 µL dan *deionized water* sampai volume 10 µL. Selanjutnya dilakukan amplifikasi dengan PCR sebanyak 40 siklus. Pemanasan pertama pada suhu 96°C selama 90 detik diikuti dengan siklus yang terdiri dari denaturasi 10 detik pada suhu 96°C , annealing 5 detik pada suhu 50°C dan 1,5 menit ekstensi pada suhu 60°C . Preparasi sekuensing dilakukan dengan mencampurkan 10 µL produk *cycle sequencing* dengan 1 µL 3M Na-acetat, 1 µL 125 mM EDTA (pH 8) dan 25 µL ethanol absolut kemudian di vortex dan didiamkan selama 15 menit. Tahap berikutnya dilakukan sentrifugasi 16.100 g selama 25 menit pada temperatur dingin (4°C). Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 70% ethanol untuk kemudian disentrifugasi ulang 16.100 g selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikering-anginkan selama 10 menit. Pelet DNA yang sudah kering ditambah dengan 10 µL HiDi-Formamide (Applied Biosystems Inc., Warrington, UK) dan di vortex. Sampel kemudian dipanaskan 95°C selama 2 menit dan segera didinginkan dalam es. Tahap selanjutnya sampel diinjeksi dengan sekuenser model ABI 3130 (Applied Biosystems Inc., Foster, California).

Analisis Bioinformatika. Analisis DNA menggunakan program BioEdit dan dilakukan penyejajaran urutan basa pada DNA Data Bank of JAPAN (DDBJ) (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/>) dengan menggunakan menu *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* versi 2.2.24. Penyejajaran sekuen hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan program *multiple alignment* Clustal × versi 1.83 dan konstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak kekerabatan genetik dilakukan dengan metode *Neighbor Joining*. Konstruksi jarak evolusi selanjutnya ditentukan dalam derajat kepercayaan menggunakan *bootstrap value* pada program NJ Plot versi 2.3.

HASIL

Penentuan Isolat Penghasil EPS. Sebanyak 30 isolat berhasil dikoleksi dari dua sampel feses orang sehat dengan menggunakan beragam media dengan dua pendekatan isolasi, yaitu isolasi langsung dan isolasi melalui pengayaan terlebih dahulu. Selanjutnya, tujuh belas isolat bakteri dengan penampakan koloni yang berbeda secara visual diseleksi untuk dianalisis lebih lanjut kemampuannya

dalam memproduksi EPS. Hasil menunjukkan bahwa ketujuh belas isolat bakteri asal saluran cerna tersebut mampu menunjukkan kapasitasnya sebagai penghasil EPS, meskipun dengan rendemen EPS yang bervariasi. Isolat FU0811 diketahui menunjukkan jumlah EPS yang tertinggi (192,7 mg/L) dari 17 galur bakteri yang diuji, sementara jumlah EPS terendah dihasilkan oleh isolat FA2203 (12,8 mg/L) (Tabel 1).

Tabel 1. Jumlah EPS yang disintesis oleh bakteri asal saluran cerna manusia.

Isolat Bakteri Saluran Cerna	Jumlah EPS (mg/L)
FU0803	128,1 ± 4,1
FU0804	94,4 ± 4,8
FU0808	63,1 ± 0,6
FU0809	33,0 ± 7,3
FU0811	192,7 ± 1,3
FU0812	121,4 ± 5,6
FU0814	120,6 ± 0,5
FU0815	36,5 ± 5,9
FU0817	99,7 ± 4,7
FU0819	135,4 ± 7,7
FU0820	88,7 ± 2,24
FA2202	111,9 ± 4,3
FA2203	12,8 ± 3,0
FA2204	52,3 ± 5,7
FA2205	38,6 ± 0,7
FA2206	40,3 ± 2,7
FA2207	109,6 ± 2,4

Karakteristik Isolat. Pengamatan morfologi koloni dari isolat-isolat bakteri yang telah dikonfirmasi sebagai penghasil EPS telah dilakukan yaitu dengan mengidentifikasi tipe tekstur koloni. Karakter umum yang sering digunakan

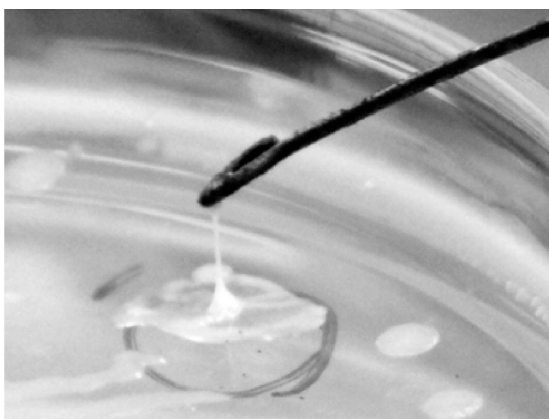
sebagai penanda galur bakteri penghasil EPS adalah karakter “ropy”, yaitu bentuk tekstur koloni yang membentuk untaian menyerupai benang lengket (Gambar 1a).

Pada penelitian ini diketahui bahwa isolat yang tidak menunjukkan karakter “ropy” ini bukan berarti tidak mampu menghasilkan EPS. Sebagai contoh, isolat bakteri FA2207 dengan tekstur koloni yang “soft” (Gambar 1b, Tabel 2) ternyata juga menunjukkan nilai rendemen EPS yang cukup tinggi (Table 1). Oleh karenanya uji kemampuan sintesis EPS secara analitik perlu dilakukan.

Tabel 2. Karakteristik morfologi koloni isolat bakteri saluran cerna manusia penghasil EPS.

Isolat Bakteri Saluran Cerna	Medium Isolasi	Tekstur Koloni*
FU0803	MRS-Sukrosa	ropy
FU0804	MRS-Glukosa	ropy
FU0808	MRS-Glukosa	soft
FU0809	MRS-Glukosa	soft
FU0811	MRS-Glukosa	ropy
FU0812	GYP	mucooid
FU0814	GYP	ropy
FU0815	GYP	ropy
FU0817	GYP	mucooid
FU0819	MRS-Sukrosa	mucooid
FU0820	MRS-Sukrosa	soft
FA2202	MRS-Sagu	soft
FA2203	MRS-Sagu	soft
FA2204	MRS-Sagu	soft
FA2205	MRS-Sagu	soft
FA2206	MRS-Sagu	soft
FA2207	MRS-Sagu	soft

* Keterangan tekstur koloni: *ropy* (lengket), *mucooid* (seperti berlendir), *soft* (lembut/empuk).



a



b

Gambar 1. Penampakan karakter “ropy” (a) dan karakter “soft” (b) isolat bakteri penghasil EPS.

Identifikasi Molekuler. Isolat bakteri saluran cerna manusia yang telah dikarakterisasi, selanjutnya diidentifikasi dengan menganalisis gen 16S rDNA. DNA bakteri hasil ekstraksi digunakan sebagai cetakan yang kemudian diamplifikasi dengan primer universal untuk prokariot (primer 20F dan 1500R) dengan produk PCR berukuran ± 1400bp. Setelah purifikasi produk PCR, sekuensing dilakukan untuk mendapatkan urutan basa pada *region* di gen 16S rDNA yang selanjutnya digunakan sebagai penentu kekerabatan bakteri.

Hasil sekuensing parsial menghasilkan panjang basa sekitar 400bp yang selanjutnya dicocokkan dengan Bank Gen DDBJ. Hasil *BLAST* menunjukkan bahwa isolat bakteri penghasil EPS yang dikoleksi dari saluran cerna manusia memiliki kemiripan urutan basa bakteri-bakteri yang telah dikenal sebelumnya dengan kisaran *similarity* 86–100%. Meskipun panjang urutan basa hasil analisis sekuensing 16S rDNA pada penelitian ini tidak mencapai panjang sekitar 1400 bp, namun cukup untuk menggambarkan secara jelas identitas beberapa isolat bakteri. Berdasarkan data tersebut maka koleksi isolat bakteri penghasil EPS dapat dikelompokkan ke dalam 7 genus, meliputi *Lactobacillus* spp. (10 galur), *Enterobacter* sp. (2 galur), *Escherichia* sp. (2 galur), *Klebsiella* sp. (1 galur), *Chronobacter* sp. (1 galur), *Staphylococcus* sp. (1 galur) dan *Alteromonas* sp. (1 galur) (Tabel 3). Beberapa anggota dari kelompok

Tabel 3. Hasil identifikasi 16S rDNA isolat penghasil EPS asal saluran cerna manusia.

Isolat Bakteri Saluran Cerna	Nama Spesies dengan Tingkat Kemiripan Terdekat (%)
FU0803	<i>Lactobacillus plantarum</i> - HM 462425 (99%)
FU0804	<i>Escherichia coli</i> - EF560776 (95%)
FU0808	<i>Lactobacillus plantarum</i> - HM 853993 (100%)
FU0809	<i>Staphylococcus warneri</i> - Z 26903 (99%)
FU0811	<i>Lactobacillus plantarum</i> - GU430841 (86%)
FU0812	<i>Klebsiella pneumonia</i> - FJ222552 (95%)
FU0814	<i>Escherichia coli</i> - EF620926 (97%)
FU0815	<i>Alteromonas macleodii</i> - Y18229 (96%)
FU0817	<i>Cronobacter malonaticus</i> - FN 539028 (98%)
FU0819	<i>Enterobacter cloacae</i> - EU046373 (86%)
FU0820	<i>Lactobacillus plantarum</i> - GU 357499 (89%)
FA2202	<i>Lactobacillus plantarum</i> - EF 422373 (96%)
FA2203	<i>Lactobacillus fermentum</i> - EF 419589 (98%)
FA2204	<i>Lactobacillus fermentum</i> - EU 130907 (96%)
FA2205	<i>Enterobacter hormaechei</i> - EU 675857 (100%)
FA2206	<i>Lactobacillus plantarum</i> - HM 462422 (96%)
FA2207	<i>Lactobacillus plantarum</i> - HM 462422 (100%)

Lactobacillus yang memiliki kekerabatan dengan spesies *L. plantarum* (7 galur) dan *L. fermentum* (3 galur) diketahui mendominasi koleksi bakteri penghasil EPS yang dapat dikultivasi asal saluran cerna manusia.

Kekerabatan isolat bakteri penghasil EPS asal saluran cerna manusia ini dapat digambarkan dengan pohon filogenetik serta menjelaskan hubungan evolusi (Gambar 2).



Gambar 2. Pohon filogenetik isolat bakteri penghasil EPS asal saluran cerna manusia

PEMBAHASAN

Ruas-Madiedo *et al.* (2007) melaporkan bahwa hasil pengamatan terhadap bakteri asam laktat diketahui bahwa sekitar 17% dari koleksi *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* asal saluran cerna mampu menghasilkan EPS. Sementara pada penelitian ini kami tidak mendapatkan isolat *Bifidobacterium*. Kesempatan mengoleksi kultur *Bifidobacterium* penghasil EPS asal saluran cerna sangat tergantung kepada kondisi donor feses, dimana jumlah dan komposisi bifidobacteria manusia cukup bervariasi

dan sangat tergantung pada pola makan individu (Dinoto *et al.*, 2006).

Lactobacillus adalah termasuk salah satu genus bakteri yang banyak dilaporkan mampu menghasilkan EPS diantaranya dari spesies *L. hilgardii*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. sakei* dan *L. parabuchneri* (Badel *et al.*, 2010), *L. casei* (Cerning *et al.*, 1994), and *L. plantarum* (Desai *et al.* 2006). EPS pada bakteri dapat dibedakan menjadi homopolisakarida dan heteropolisakarida tergantung dari komposisi monosakarida penyusunnya (Sutherland *et al.*, 1972). *L. fermentum* dilaporkan menghasilkan homopolisakarida berupa dekstran yang tersusun atas glukukan (β -Glcp) yang terikat pada ikatan α -(1,6) (Krajl *et al.*, 2004). Sementara *L. plantarum* diketahui memproduksi heteropolisakarida yang tersusun atas variasi monosakarida glukosa, rhamnosa dan galaktosa (Talon *et al.*, 2003).

Penelitian ini mengindikasikan keberadaan isolat bakteri saluran cerna yang memiliki kekerabatan terdekat dengan *Alteromonas macleodii* (Tabel 3). Keberadaan EPS yang diekskresikan oleh sel bakteri dari genus *Alteromonas* asal sebelumnya pernah dilaporkan Bozzi *et al.* (1996) dan Jouault *et al.* (2001). Keberadaan EPS bakteri yang mengandung fukosa meliputi asam kolanat, *clavan* dan fukogel banyak dijumpai pada beberapa genus *Enterobacteriaceae* meliputi *Enterobacter*, *Salmonella*, *Escherichia* dan *Klebsiella* (Alves *et al.*, 2010, Freitas *et al.* 2011, Ratto *et al.*, 2006). *Klebsiella pneumoniae* I-1507 dilaporkan dapat memproduksi fukogel berupa polisakarida yang mengandung galaktose, 4-O-asam asetil-galakturonat dan fukose. Telah dilaporkan pula bahwa *Klebsiella oxytoca* dapat menghasilkan EPS dengan menggunakan glukosa (Feng *et al.*, 2009) dan laktosa (Dlamini *et al.*, 2009) sebagai sumber karbon.

Secara umum hasil penelitian ini menunjukkan keanekaragaman bakteri asal saluran cerna yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan EPS. Setidaknya sebanyak 17 isolat bakteri telah berhasil dikarakterisasi dan diidentifikasi dengan analisis 16S rDNA parsial. Isolat-isolat bakteri tersebut dapat dikelompokkan ke dalam tujuh genus berbeda meliputi *Lactobacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Cronobacter* sp., *Staphylococcus* sp. dan *Alteromonas* sp. Kelompok *Lactobacillus* diketahui mendominasi koleksi isolat yang dapat dikultivasi meliputi isolat yang memiliki yang memiliki kekerabatan terdekat dengan spesies *L. plantarum* (7 galur) dan *L. fermentum* (2 galur).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pusat Penelitian Biologi-LIPI atas dukungan penyelenggaraan penelitian. Terima kasih juga diucapkan kepada Kementerian Riset dan Teknologi (KNRT) Republik Indonesia atas pembiayaan penelitian dalam Program Insentif KNRT Tahun 2010.

KEPUSTAKAAN

- Alves VD, Freitas F, Torres CAV, Cruz M, Marques R, and Grandfils C. 2010. Rheological and morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production by *Enterobacter* sp. *Carbohydrate Polymers* 81: 758–764.
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, and Gordon JI. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307: 1915–1920.
- Badel S, Bernardi, T, and Michaud P. 2010. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*. *In Press*.
- Bozzi L, Milas M, and Rinaudo M. 1996. Characterization and solution properties of a new exopolysaccharide excreted by the bacterium *Alteromonas* sp. strain 1644. *International Journal of Biological Macromolecules* 18: 9–17.
- Cerning J, Renard CMGC, Thibault JF, Bouillanne C, Landon M, Desmazeaud M, and Topisirovic L. 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3914–3919.
- Desai KM, Akolkar SK, Badhe YP, Tambe SS, and Lele SS. 2006. Optimization of fermentation media for exopolysaccharide production from *Lactobacillus plantarum* using artificial intelligence-based techniques. *Process Biochemistry* 41: 1842–1848.
- Dinoto A, Marques TM, Sakamoto K, Fukiya S, Watanabe J, Ito S, and Yokota A. 2006. Population dynamics of *Bifidobacterium* species in human feces during raffinose administration monitored by fluorescence in situ hybridization-flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7739–7747.
- Dlamini, AM, Peiris PS, Bavor JH, and Kailasapathy K. 2009. Rheological characteristics of an exopolysaccharide produced by a strain of *Klebsiella oxytoca*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107: 272–274.
- Feng L, Li X, Duc G, and Chen J. 2009. Characterization and fouling properties of exopolysaccharide produced by *Klebsiella oxytoca*. *Bioresource Technology* 100: 3387–3394.
- Freitas F, Alves VD, Torres CAV, Cruz M, Sousa I, Melo MJ, Ramos AM, and Reis MAM. 2011. Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated *Enterobacter* strain A47 DSM 23139. *Carbohydrate Polymers* 83: 159–165.

- Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, and Nelson KE. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312: 1355–1359.
- Hiraishi A, Kamagata Y, and Nakamura. 1995. Polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from methanogens. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79: 523–529.
- Jouault SC, Chevotot L, Helley D, Ratiskol J, Bros A, Sinquin C, Roger O, and Fischer AM. 2001. Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1528: 141–151.
- Kralj S, van Geel-Schutten GH, Dondorff MMG, Kirsanovs S, van der Maarel MJEC, and Dijkhuizen L. 2004. Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucanase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology* 150: 3681–3690.
- Mozzi F, Torino MI, and de Valdez GF. 2001. Identification of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria. In: Spencer JFT and de Spencer ALR (eds). *Food Microbiology Protocols*. Human Press, Inc. New Jersey.
- Ratto M, Verhoef R, Suihko ML, Blanco A, Schols H. A, and Voragen AGJ. 2006. Colanic acid is an exopolysaccharide common to many Enterobacteria isolated from paper-machine slimes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33: 359–367.
- Ruas-Madiedo P, Moreno JA, Salazar N, Delgado S, Mayo B, Margolles A, and de los Reyes-Gavilán CG. 2007. Screening of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4385–4388.
- Sabetsky V. 2004. Oral insulin composition and methods of making and using thereof field of the invention. Patent WO/2004/078196.
- Sutherland IW. 1972. Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology* 8: 143–213.
- Talon R, Bressollier P, Urdaci MC. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res Microbiol* 154: 705–712.

Reviewer: **Tim Reviewer**