

PENGUJIAN TOKSISITAS DADIH SUSU SAPI MUTAN *Lactococcus lactis* DENGAN METODE *BRINE SHRIMPS*

Oleh :

Deni Novia, Indri Juliyarsi dan M. Ridwan

Abstract

Research conducted for to test ability dadih SML (Susu Sapi Mutan *Lactococcus lactis*) in pursuing growth of cancer by using *Brine Shrimps Method*. Egg *Artemia Leach Salina* included into sea water, will hatch within 24 hour form larva (nauplii) and afterwards can be used as by test animal. Extract to test to be to be made by condensation with concentration 10, 100 and 1000 $\mu\text{g/ml}$. amount of used by larva each; every perception is 10 tail, death of prawn perceived by after 24 hour obtained to be data to be processed with *Finney Computer* to calculate LC_{50} by amount of dead prawn each; every concentration. An extract show sitotoksik activity if/when $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$.

Result of this research indicate that dadih SML have sitotoksik activity at the price of LC_{50} under 1000 $\mu\text{g/ml}$, that is 357,7252 $\mu\text{g/ml}$, used as by nisin is comparator have the character of actively of sitotoksik at the price of LC_{50} 201,1801 $\mu\text{g/ml}$. This means dadih SML can pursue growth of cancer, for the step of hereinafter have to be executed by research continue that is mencit, so that known by its ability percentage in pursuing cancer cell.

Keyword : toksisitas, *Lactococcus lactis* mutant, sitotoksik, *Lethal Concentration* (LC), Finney

PENDAHULUAN

Susu fermentasi sudah sejak lama dikenal di Indonesia, khususnya pada daerah Sumatera Barat yang dikenal dengan nama dadih. Dadih merupakan makanan tradisional dari Sumatera Barat yang berasal dari susu kerbau yang dimasukkan ke dalam tabung bambu, ditutup dengan daun pisang dan diperam pada suhu kamar $\pm 30^\circ\text{C}$ selama kurang lebih 2 hari sampai susu menggumpal. Dadih sering ditemui pada masyarakat pedesaan yang biasanya digunakan sebagai makanan adat (Sugitha, 1996).

Sebagai produk susu fermentasi, dadih memiliki beberapa keunggulan yaitu nilai gizi yang tinggi dengan adanya mikroorganisme yang terlibat dalam fermentasi susu yang dapat menghasilkan vitamin B, dimana pada proses penggumpalan terjadi akibat adanya asam-asam laktat yang merupakan hasil fermentasi bakteri tertentu terhadap laktosa (Dwijoseputro, 1978).

Bakteri asam laktat yang umum terdapat dalam dadih adalah *Lactococcus lactis* dan *Lactobacillus acidophilus* (Sugitha, 1990). Bakteri ini akan menghasilkan

senyawa antibiotika natural yang dapat mengontrol bakteri patogen dalam usus, seperti *Lactobacillus acidophilus* menghasilkan acidophilin dan *Lactococcus lactis* menghasilkan nisin (Helferich, 1980), Harsanti (2001), dalam penelitiannya, menemukan bahwa di dalam dadih susu kerbau yang mengandung bakteri asam laktat, didominasi oleh bakteri *Lactococcus* yang menghasilkan nisin, yang digunakan sebagai pengawet dalam produk susu dan keju (Einarson dan Lauzon, 1995). Nisin merupakan bakteriosin pertama yang dipisahkan pada proses fermentasi bakteri asam laktat yang berguna untuk mencegah pertumbuhan spora *Clostridium botulinum* dalam keju. Nisin menghambat bakteri gram positif dan spora seperti *Clostridium botulinum* dan organisme yang tahan panas namun tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif, khamir dan fungi (Friedman, 1996).

Ayebo (1980) cit Sugitha (1996), melaporkan bahwa *Lactococcus lactis* yang dipakai dalam pembuatan yoghurt (susu fermentasi) dan diberikan pada tikus percobaan yang telah disuntik tumor maligna, ternyata sel tumor dapat ditekan hingga 30-45% karena adanya nisin yang dihasilkan *Lactococcus lactis* ini dapat mencegah timbulnya kanker.

Melia (2003) dalam penelitiannya, menentukan karakteristik dari bakteriosin nisin pada dadih susu sapi mutan *Lactococcus lactis* yang memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan spora, juga dapat sebagai biopreservatif makanan serta diyakini mampu menghambat pertumbuhan sel kanker. Dadih SML (fermentasi 48 jam) dibuat dengan menginokulasikan mutan *L.lactis* 2%, memperlihatkan kemampuan dalam menghambat aktivitas mikroba patogen yaitu *Escherichia coli* (indeks mikroba 1,0), *Staphylococcus aureus* (indeks mikroba 0,6) dan *Salmonella typhi* (indeks mikroba 0,7). Sedangkan pengujian kualitas dadih SML menghasilkan total koloni 118×10^5 CFU/g, tingkat keasaman 0,93%, pH 4,80, kekentalan 10,5 cPa, kandungan air 74,47%, protein 5,62% dan lemak 6,39% sedangkan dadih susu kerbau memiliki total koloni 106×10^5 CFU/g, tingkat keasaman 0,90-1,42%, pH 4,60, kekentalan 12,06 cPa, kandungan air 70,25%, protein 4,70% dan lemak 9,05%. Jenis asam amino esensial yang terdapat pada dadih SML adalah histidin, arginin, threonin, valin, methionin, isoleusin, leusin, phenil alanin dan lisin.

Berdasarkan pemikiran diatas, permasalahan yang diangkat dalam penelitian ini adalah bagaimana pengembangan ilmu mengenai kemampuan dari dadih susu sapi mutan *Lactococcus lactis* (dadih SML) dalam menghambat pertumbuhan kanker, yang terlebih dahulu ditentukan aktivitas sitoksiknya dengan uji toksitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach (*Brine Shrimp Lethality Bioassay*). Uji ini dapat digunakan sebagai skrining awal terhadap senyawa anti tumor dan mempunyai korelasi positif dengan potensi sebagai anti tumor (Meyer, 1982).

Tujuan penelitian mengetahui kemampuan mutan *Lactococcus lactis* dari dadih susu sapi untuk menghambat pertumbuhan kanker dengan pengujian awal menggunakan metode *Brine Shrimps*. Dadih yang dihasilkan dari mutan *Lactococcus lactis*, diharapkan dapat memiliki kemampuan dalam menghasilkan bakteriosin nisin yang dapat mencegah pertumbuhan kanker sehingga dadih mempunyai nilai tambah sebagai makanan kesehatan yang akan dikembangkan dalam teknologi industri pangan.

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Indonesia (STIFI) Padang pada tanggal 7-16 Agustus 2006. (a) *Alat-alat* : seperangkat alat kaca untuk penetas udang, camber, vial, spatel, pinset, pipet dan mikropipet, timbangan analitik. (b) *Bahan* : Dadih yang mengandung mutan *Lactococcus lactis* (Dadih Susu Sapi Mutan *Lactococcus lactis*), nisin, , air suling dan air laut (c) *Hewan Percobaan* : Larva udang *Artemia salina* Leach.

Telur *Artemia salina* Leach dimasukkan kedalam air laut, akan menetas dalam jangka waktu 24 jam membentuk larva (nauplii) dan setelah itu dapat digunakan sebagai hewan uji. Ekstrak yang akan diuji dibuat larutan dengan konsentrasi 10, 100 dan 1000 µg/ml. Jumlah larva yang digunakan setiap pengamatan adalah 10 ekor. Kematian udang diamati setelah 24 jam. Data yang diperoleh diproses dengan komputer Finney untuk menghitung LC_{50} dengan memasukan jumlah udang yang mati setiap konsentrasi. Suatu ekstrak menunjukkan aktivitas sitotoksik bila $LC_{50} < 1000$ µg/ml.

Prosedur kerjanya (a) *Persiapan alat dan bahan* : Tujuh seri vial yang terdiri atas 3 seri vial untuk dadih SML, 3 seri untuk nisin dan 1 seri untuk kontrol. Satu seri vial terdiri dari 9 vial uji, dimana masing-masing vial ditandai dengan konsentrasi 10, 100, 1000 µg/ml. (b) *Persiapan hewan percobaan* : Hewan percobaan yang dipakai larva udang *Artemia salina* Leach. Larva ini diperoleh dengan cara merendam telur udang 2 hari sebelum dilakukan uji. Penetasan dilakukan dengan cara merendam telur tersebut ke dalam air laut secukupnya dan ditempatkan di tempat yang terang. (c) *Penyiapan sample* : Dibuat larutan dadih SML dan nisin dalam air dengan kadar 10 mg/ml sebanyak 5 ml. Kemudian larutan dadih dan nisin dipipet dan dimasukkan ke dalam vial uji masing-masing sebanyak 5 µl, 50 µl dan 500 µl untuk memperoleh kadar akhir 10, 100, 1000 µg/ml. (d) *Perhitungan LC_{50}* : Dilakukan dengan memasukan larva udang yang baru menetas ke dalam vial uji bersama air laut masing-masing 10 ekor, tepatkan volume dengan air laut hingga 5 ml. Simpan di tempat yang cukup cahaya selama 24 jam. Hitung jumlah larva yang mati, dan hitung harga LC_{50} dadih dan nisin dengan komputer program Finney.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Dari serangkaian penelitian tentang uji toksisitas dadih susu sapi mutan *Lactococcus lactis* maka didapatkan hasil sebagai berikut : Uji toksisitas dadih SML dengan metode *Brine Shrimps (Brine Shrimp Letality Bioassay)* menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach didapatkan bahwa dadih SML memiliki aktivitas sitotoksik dengan harga LC_{50} dibawah 1000 µg/ml, yaitu 357,7252 µg/ml dan nisin yang digunakan sebagai pembanding bersifat aktif sitotoksik dengan harga LC_{50} 201,1801 µg/ml seperti yang terlihat pada tabel dibawah ini :

Tabel . Hasil uji pendahuluan toksisitas dadih susu sapi mutan *Lactococcus lactis* dan nisin

Jumlah (ekor)	Kontrol	Konsentrasi dadih SML ($\mu\text{g/ml}$)			Konsentrasi nisin ($\mu\text{g/ml}$)		
		10	100	1000	10	100	1000
Total Sampel (ekor)	90	90	90	90	90	90	90
% kematian	0	3,33	6,67	83,33	10	13,33	93,33
Log		1,0	2,0	3,0	1,0	2,0	3,0
Konsentrasi							
Nilai probit		2,298	4,037	5,776	3,116	4,561	6,006
LC ₅₀		357,7252 $\mu\text{g/ml}$			201,1801 $\mu\text{g/ml}$		

* Perhitungan dilakukan dengan komputer Finney

Penelitian dengan metode *Brine Shrimps* merupakan penapisan awal yang dapat dilakukan terhadap ekstrak ataupun senyawa murni untuk melihat aktivitas sitotoksiknya, yang diduga mempunyai efek sebagai anti tumor.

Larva *Artemia salina* memiliki siklus hidup yang terdiri dari berbagai fase, sel-selnya membelah dengan cepat sehingga dapat dianalogkan sebagai sel-sel kanker. Keunggulan lain larva ini mudah didapat dan dapat disimpan dalam waktu yang lama. Larva yang digunakan telah berumur 24-48 jam karena pada umur tersebut larva bisa jelas diamati.

Dadiah yang digunakan adalah dadiah susu sapi mutan *L. lactis* yang menghasilkan antibiotika nisin. Bakteriosin nisin pada dadiah susu sapi mutan *Lactococcus lactis* yang memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan spora, juga dapat sebagai biopreservatif makanan serta diyakini mampu menghambat pertumbuhan sel kanker (Melia, 2003).

Penentuan tingkat toksisitas dadiah SML dan nisin terhadap larva udang dapat dilakukan dengan menghitung LC₅₀ dalam hal ini dengan menggunakan program komputer Finney. Apabila harga LC₅₀ lebih besar dari 1000 $\mu\text{g/ml}$ berarti tidak aktif sitotoksik. Standar diambil sesuai dengan ketentuan Meyer (1982).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penapisan dadiah susu sapi mutan *Lactococcus lactis* dengan uji toksisitas terhadap larva udang didapatkan harga LC₅₀ 357,7252 $\mu\text{g/ml}$ dan nisin yang digunakan sebagai pembandingan bersifat aktif sitotoksik dengan harga LC₅₀ 201,1801 $\mu\text{g/ml}$, hasil dadiah susu sapi mutan *Lactococcus lactis* lebih baik sehingga dapat dilakukan uji lanjut kepada hewan percobaan seperti mencit (*Mus musculus*).

Berdasarkan hasil penelitian ini diharapkan untuk langkah kerja selanjutnya menggunakan hewan percobaan mencit ataupun kelinci dengan berbagai variasi dosis sehingga dapat diketahui manfaat lebih dari pada dadih SML ini dan dapat memasyarakatkan dadih sebagai makanan kesehatan (*health food*) yang berkhasiat mencegah kanker pada manusia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak Dr. Ir. I Made Sugitha, MSc, Bapak Dr. M.Husni Mukhtar, MS, DEA, Apt dan Desy Eka Putri, S.Si, Apt (STIFI Padang) atas bantuannya sehingga penelitian ini terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

- Ayebo, A.D. 1980. Effectivities Fermented Milk to Decreasing Cancer and Tumor Attack. Nebraska University. New Delhi.
- Dwijoseputro, D., 1978. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerbit Djembatan. Jakarta.
- Einarson, H., H. Lauzon. 1994. *Biopreservative of Brine Shrimp by Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria*. J. Appl And Enviroment. Microbiol. 669-676.
- Friedman, Y. 1996. *Lactid Acid Bacteria As Food Preservative*. Int J. Food Microbiol.
- Harsanti, S.U. 2001. *Uji Bioaktifitas Bakteriosin Pada Dadih di Sumatera Barat*. Tesis Pasca Sarjana. Universitas Andalas. Padang.
- Helfrerich, W and D. Westhoff. 1980. *All About Yoghurt*. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs. New Jersey.
- Melia, Sri. 2002. *Karakteristik Bakteriosin Nisin Pada Dadih Susu Sapi Mutan Lactococcus lactis*. Tesis Pasca Sarjana. Universitas Andalas. Padang.
- Meyer, B.N., N.R. Ferrigni, J.E. Putman, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, and J.L. McLaughlin. *Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent*. In *Planta Med* 45.
- New Lander, J.A and H.V. Artherton. 1982. *Chemistry and Testing of Dairy Products*. The AVI Publ, Co. Westport. Connecticut.
- Rahman, A., S. Fardiaz dan W.P Rahayu. 1992. *Teknologi Fermentasi Susu*. Dikti. PAU Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Robinson, R. K and A. Y. Tamime. 1981. *Microbiology of Fermented Milks, in Dairy Microbiology*. Vol. I : The Microbiology of Milk. Edited by Applied Science Pubh. London.

Sugitha, I.M dan M. Djajil. 1989. *Susu, Penanganan dan Teknologinya*. Fakultas Peternakan. Unuversitas Andalas. Padang.

Sugitha, I. M. 1994. *Dadih Dapat Hindari Serangan Tumor dan Jantung*. Singgalang 4 September 1994.

_____. 1995. *Olahan Susu Kerbau Tradisional Minang, Manfaat, Kendala dan Prospeknya dalam Era Industrialisasi Sumatera Barat*. Seminar Sehari Teknologi Hasil Ternak. Fakultas Peternakan, Universitas Andalas. Padang.

_____, H. Muchtar, Kharsad dan Yuherman. 1999. *Rekayasa Dadih dengan Streptococcus lactis dan Lactobacillus acidophilus untuk Mencegah Kanker dan Mengurangi Kolesterol Darah*. Laporan Hibah Bersaing Perguruan Tinggi. Fakultas Peternakan, Universitas Andalas. Padang.