

Deskripsi

**LACTOBACILLUS PLANTARUM STRAIN IS-10506 DAN STRAIN IS-20506,
ENTEROCOCCUS FAECIUM IS-27526 ASAL DADIH BERSIFAT PROBIOTIK**

5

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan strain bakteri asam laktat asal dadih *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan strain IS-20506, *Enterococcus faecium* strain IS-27526 sebagai bakteri probiotik, dengan sifat-sifat viabilitas tahan terhadap lisozim, asam lambung, garam empedu, dapat menempel, berkolonisasi pada saluran cerna manusia dan hewan dan melawan bakteri patogen, dan dapat meningkatkan respon imun secara *in vivo* dan pada manusia. *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan *Enterococcus faecium* strain IS-27526, masing-masing dapat meningkatkan respon imun anak balita dan meningkatkan status gizi anak balita kurang gizi.

20

Latar Belakang Invensi

Bakteri probiotik, termasuk diantaranya *Lactobacillus plantarum* dan *Enterococcus faecium* adalah kelompok bakteri asam laktat dengan status GRAS, *Generally Recognized As Safe* (Mogensen et al, 2002) yang sangat strain spesifik, dan tersedia secara komersial, baik dalam bentuk makanan fungsional maupun suplemen. *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan strain IS-20506 serta *Enterococcus faecium* strain IS-27526 adalah bakteri asam laktat asli Indonesia asal dadih, susu fermentasi tradisional asal Sumatra Barat, merupakan bakteri gram positif, katalase negative, memfermentasi glukosa menjadi asam laktat, dan digunakan dalam invensi ini.

35

Bakteri probiotik bermanfaat menjaga fungsi saluran cerna, menjaga keseimbangan mikrobiota dalam saluran cerna, dan beberapa diantaranya mampu membantu meningkatkan respon imun pada manusia. Ketidak seimbangan mikrobiota saluran

cerna akan mengakibatkan gangguan pencernaan, penyerapan nutrisi yang tidak optimal serta rentan terhadap berbagai infeksi penyakit.

5 Berdasarkan penelusuran paten dunia, terdapat 3 paten dari bakteri *Lactobacillus plantarum*, yaitu paten **WO2007003917**, *Lactobacillus plantarum* berkemampuan sebagai kultur starter, mempunyai aktivitas melindungi sebagai bakteri probiotik, mampu bertahan dalam saluran cerna secara *in vivo*, mampu menekan atau menghambat pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan dalam saluran cerna, mampu menempel pada saluran cerna dan mampu memperkuat ketahanan terhadap lapisan sel epitel terhadap bakteri patogen, mampu bertahan pada pH 5 atau lebih rendah dari 5, dan tahan terhadap asam dan garam empedu, menekan pertumbuhan maupun memberikan efek antimikroba terhadap salah satu atau lebih dari *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* atau *Campylobacter*. Dan paten **KR20030063961**, serta **WO2005007834** mendeskripsikan *Lactobacillus plantarum* Probio-20 38 (KCCM-10329), suatu bakteri probiotik asal lambung babi yang toleran terhadap asam yang menekan pertumbuhan bakteri patogen, efektif mencegah dan menangani diare pada hewan peliharaan yang disebabkan oleh bakteri patogen.

25 Invensi ini terbukti menemukan bakteri probiotik strain asli Indonesia asal dadih, susu kerbau fermentasi tradisional asal Sumatra Barat, yang viabilitasnya tetap tinggi dalam saluran cerna, menghambat bakteri patogen, serta bermanfaat mempertahankan dan meningkatkan respon imun, khususnya sekretori IgA, sehingga memperkuat ketahanan 30 tubuh dan membantu menekan terjadinya berbagai infeksi penyakit.

Ringkasan Invensi

35

Invensi ini berkenaan dengan strain bakteri probiotik asli Indonesia asal dadih, *Lactobacillus plantarum* strain

IS-10506 dan strain IS-20506, *Enterococcus faecium* strain IS-27526 yang bersifat probiotik. Pada invensi ini sifat probiotik yang dibuktikan adalah viabilitas yang tinggi dan tahan terhadap hambatan asam lambung dan garam empedu, dapat menempel, berkolonisasi dan melawan bakteri patogen, meningkatkan respon imun secara *in vivo* dan pada anak balita kurang gizi.

Salah satu sistem yang berhubungan dengan kekebalan tubuh adalah sistem imun humoral khususnya sekretori antibodi IgA, yang terutama diproduksi oleh MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue), berkaitan dengan mukosa usus, dan mencerminkan respon imun saluran cerna.

Salah satu respon imun yang paling banyak terjadi pada mukosa adalah respon imun humoral dan produksi sIgA (sekretori IgA). sIgA tahan terhadap proteolisis intraluminal dan tidak menimbulkan respon inflamasi, sehingga sIgA ideal untuk menjaga permukaan mukosa dari antigen dengan cara mencegah pelekatan antigen pada sel epitel.

Invensi ini adalah bakteri *L. plantarum* strain IS-10506 dan strain IS-20506, serta *Enterococcus faecium* strain IS-27526 strain-strain asli Indonesia bersifat probiotik dan memberikan pengaruh positif terhadap kesehatan saluran cerna dan daya tahan tubuh, khususnya respon imun humoral yaitu sekretori IgA.

Invensi selanjutnya juga berkenaan dengan produk makanan, suplemen dan atau minuman yang mengandung strain bakteri probiotik asli Indonesia asal dadih, *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan strain IS-20506, *Enterococcus faecium* strain IS-27526, dan dengan metode serta penggunaannya untuk menstimulasi respon imun dengan strain bakteri *Lactobacillus plantarum* atau *Enterococcus faecium* dari invensi ini.

Uraian Singkat Gambar

Gambar 1 adalah grafik yang menggambarkan pengaruh jenis Probiotik terhadap sIgA feses tikus putih Sprague Dawley.

5 Gambar 2 Gambaran perbedaan signifikan dari suplementasi probiotik *L. plantarum* IS-10506 (A1) dibandingkan dengan kelompok kontrol (A0),

10 Gambar 3 adalah profil bakteriologis pasca perlakuan probiotik *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) dan *Lactobacillus plantarum* IS 10506 (LIS) pada mencit Balb/c.

Gambar 4 adalah gambaran kemampuan bakteri probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506 yang beradesi sangat kuat pada mukosa usus manusia dibandingkan dengan bakteri asam laktat asal dadih lainnya.

15 Gambar 5 adalah peningkatan sIgA saliva total dari plasebo dan probiotik.

Gambar 6 adalah Skema Kerja High Pure PCR Template Preparation Kit.

20 Uraian Lengkap Invensi

Invensi ini adalah suatu proses dalam menseleksi bakteri asam laktat asal dadih sebagai bakteri probiotik yang bermanfaat untuk menjaga kesehatan saluran cerna, menjaga keseimbangan mikrobiota saluran cerna, mempertahankan dan meningkatkan daya tahan tubuh. Proses seleksi bakteri probiotik melalui tahap-tahap berikut :

- a) Mengisolasi bakteri asam laktat dari produk susu fermentasi dadih
- 30 b) Purifikasi bakteri asam laktat asal dadih
- c) Seleksi *in vitro* bakteri asam laktat asal dadih yang tahan asam dan garam empedu sehingga diperoleh kandidat probiotik
- d) Identifikasi kandidat probiotik dengan API Zyme Kit dan identifikasi molekuler dengan real time PCR, sehingga
- 35 diketahui sequens nukleotidanya (Tabel 1).

- e) Menguji kemampuan menempel (beradesi) pada sel epitelial usus manusia dan berkompetisi dengan bakteri patogen
- f) Menguji viabilitas bakteri probiotik *in vivo* dalam feses dengan tikus putih Sprague Dawley dan mencit Balb/c.
- 5 g) Menguji secara *in vivo* kemampuan bakteri probiotik dalam meningkatkan sekretori IgA
- h) Menguji pada anak balita kurang gizi kemampuan bakteri probiotik dalam meningkatkan sekretori IgA
- i) Menguji pada anak balita kurang gizi kemampuan bakteri probiotik dalam meningkatkan status gizi khususnya berat badan anak balita
- 10 j) Menguji pada penderita HIV dewasa kemampuan bakteri probiotik dalam kemampuan berkolonisasi pada saluran cerna dengan uji kualitatif real time PCR
- 15 k) Membuktikan fungsi probiotik pada orang dewasa sehat, dan penderita HIV serta anak bawah lima tahun

Invensi ini selanjutnya bertujuan untuk memproduksi bakteri probiotik *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan strain IS-20506 serta *Enterococcus faecium* strain IS-27526 dengan metode freeze drying (kering beku) maupun Fluidized Bed Dryer (FBD) yang dimikroenkapsulasi dengan viabilitas 10^{10} - 10^{20} koloni/g, yang dapat diproduksi juga dalam bentuk kaplet, soft gel, kapsul, tablet hisap maupun sebagai ingredien makanan fungsional.

20

25

Pada penelitian ini isolat bakteri asam laktat yang digunakan adalah *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan IS-20506, *Enterococcus faecium* IS-27526.

30 **METODE ANALISIS ELISA**

Analisis antibodi IgA dilakukan dengan menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). ELISA adalah metode yang dapat digunakan untuk pendeteksian dan pengukuran respon imun humoral secara *primary binding test* yaitu berdasarkan interaksi antigen-antibodi. ELISA dapat digunakan untuk mengukur kadar antibodi maupun antigen. Uji ini paling sensitif (dalam hal kadar antibodi yang dapat

35

dideteksi) karena secara langsung mengukur interaksi antigen-antibodi. Kadar terkecil dari antibodi/antigen yang dapat terdeteksi dengan metode ELISA adalah 0.0005 µg protein/ml (Tizard, 1988).

5 Pada penelitian ini teknik ELISA yang digunakan adalah *sandwich* ELISA. Menurut Crowther (1995) *Sandwich* ELISA terdiri dari delapan tahap sebagai berikut : 1. Adsorpsi antibodi secara pasif terhadap fase solid; 2. Pencucian; 3. Penambahan antigen; 4. Pencucian; 5. Penambahan antibodi yang dilabeli enzim; 6. Pencucian; 7. Penambahan sistem pembentuk warna (substrat); 8. Pembacaan dengan ELISA reader. Fase pencucian bertujuan untuk memisahkan reagen yang membentuk kompleks antibodi-antigen dengan yang tidak.

10 Prinsip metode *sandwich* ELISA ini adalah: melapis mikroplate dengan antibodi anti IgA-tikus yang dapat mengikat antigennya yaitu antibodi IgA yang ada pada sample, baik serum maupun ekstrak feses. Antibodi yang sudah berikatan ini, kemudian ditambahkan dengan antigennya lagi yaitu antibodi sekunder anti IgA tikus yang telah ditempelkan dengan enzim. Jumlah antibodi sekunder yang berikatan sebanding dengan antibodi IgA yang terdapat pada sample. Enzim yang melekat pada antibodi sekunder tersebut akan bereaksi menghasilkan warna jika ditambahkan dengan substratnya, yang dapat diukur kerapatan optikalnya (OD) pada panjang gelombang tertentu.

20 Intensitas warna yang terbentuk akan sebanding dengan banyaknya antibody berenzim yang berikatan dengan IgA sampel. Semakin banyak antibody IgA pada sampel maka semakin banyak jumlah antibody berenzim yang berikatan dan semakin tinggi pula intensitas warna yang terbentuk (OD).

METODE ANALISA KUALITATIF REAL TIME PCR

Prosedur Kerja :

1. **Isolasi DNA bakteri *Lactobacillus plantarum*** dari sampel klinis dengan High Pure PCR Template Preparation Kit (manual isolasi)

35

Preparasi reagen ekstraksi DNA

Vial/Cap	Label	Contents / Function
1 white	Tissue Lysis Buffer	• 20 ml • [4 M urea, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7.4 (25°C)]
2 green	Binding Buffer	• 20 ml • [6 M guanidine-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton X-100 (v/v), pH 4.4 (25°C)]
3 pink	Proteinase K, recombinant PCR grade	• Lyophilizate • For sample lysis and inactivation of endogenous DNase
4a black	Inhibitor Removal Buffer	• 33 ml, add 20 ml absolute ethanol • [5 M guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6 (25°C) final concentration after addition of ethanol]
4 blue	Wash Buffer	• 20 ml, add 80 ml absolute ethanol • [20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 (25°C) final concentrations after addition of ethanol]
5 colorless	Elution Buffer	• 40 ml • [10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (25°C)]
	High Pure Filter Tubes	Two bags with 50 polypropylene tubes with two layers of glass fiber fleece, for use of up to 700 µl sample volume.
	Collection Tubes	Eight bags with 50 polypropylene tubes (2 ml).

Preparasi Reagen Ekstraksi DNA

Content	Reconstitution/Preparation	Storage and Stability	For use in
Proteinase K (Vial 3; pink cap)	Dissolve Proteinase K in 4.5 ml double distilled water, aliquot solution.	Store at -15 to -25°C. Stable for 12 months.	Sample Lysis and DNA Binding Protocol step 1
Inhibitor Removal Buffer (Vial 4 a; black cap)	Add 20 ml absolute ethanol to Inhibitor Removal Buffer. ⚠ Label and date bottle accordingly after adding ethanol.	Store at +15 to +25°C. Stable through the expiration date printed on kit label.	Washing and Elution Protocol step 1
Wash Buffer (Vial 4; blue cap)	Add 80 ml absolute ethanol to Wash Buffer. ⚠ Label and date bottle accordingly after adding ethanol.	Store at +15 to +25°C. Stable through expiration date printed on kit label.	Washing and Elution Protocol step 2 and 3

5

- Alikuot Elution buffer (sejumlah : 200 ul elution buffer x jumlah sampel yang akan diproses), kemudian di prewarmed terlebih dahulu pada suhu 72°C, baru elution buffer dapat digunakan pada tahapan elusi.

10

Keterangan (Optimasi proses isolasi DNA) :

- Pada tahapan pencampuran sampel dengan binding buffer dan proteinase K, tambahkan waktu inkubasi dalam heating block (72°C) selama 15 menit.

5

Reagen : Proses Amplifikasi DNA bakteri *Lactobacillus Plantarum*

Instrumen : Real time PCR BioRad IQ5

No	Nama Reagen	No. Katalog	Kemasan	Keterangan
1	FastStart SYBR Green Master (without Rox reference dye)	04673484001	200 rx	Komponen MMX PCR (amplifikasi DNA) dalam realtime PCR IQ5
2	Primer spesifik spesies <i>recA</i> gen <i>Lactobacillus plantarum</i> 5' - CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA - 3' Forward 5' - TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC _ 3' Reverse.			
3	Kontrol positif, diambil dari kultur sel <i>Lactobacillus plantarum</i>			

10

Realtime PCR :

PCR 40 x, terdiri dari :	Suhu	Waktu
Denaturasi	95 °C	10 menit
Annealing	55-60 °C	1 Menit
Elongation	72 °C	1 Menit
Melting Curve		
Pendinginan		

METODE PENELITIAN

A. PERSIAPAN STRAIN BAKTERI DAN KONDISI KULTUR

Bakteri probiotik *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan *Lactobacillus plantarum* strain IS-20506, *Enterococcus faecium* strain IS-27526 disiapkan dalam bentuk sediaan kultur kering beku, dan disimpan di Functional Foods Forum Culture Collection, University of Turku, Finland. Ketiga strain bakteri tersebut diisolasi dari dadih dan diidentifikasi dengan API zyme kit (BioMerieux, Perancis), kemudian dikonfirmasi dengan identifikasi molekuler dengan gen 16S rRNA sebagai *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan strain IS-20506 (GeneBank accession no DQ860148 dan DC860149), serta *Enterococcus faecium* strain IS-27526 (GeneBank accession no EF068251). Bakteri asam laktat ini ditumbuhkan dalam kaldu MRS (Oxoid, Basingstoke, UK) pada 37 °C selama 18 jam dalam kondisi aerobik, dipanen dengan sentrifusi (3,200 × g, 4°C, 20 min) dan dicuci dua kali dengan menggunakan buffer PBS steril (pH 7.0). Viabilitas dan kemurnian sel bakteri diuji dengan plate count pada cawan Petri MRS agar.

Bakteri patogen yang digunakan adalah *Bacteroides vulgatus* DSM 1447, *Clostridium histolyticum* DSM 627, *Escherichia coli* K2, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 12028 dan *Staphylococcus aureus* DSM 20231. Bakteri patogen ditumbuhkan pada media GAM agar (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) pada kondisi anaerobik (10% H₂, 10% CO₂, and 80% N₂; Concept 400 anaerobic chamber, Ruskin Technology, Leeds, UK). Bakteri diberi label dengan penambahan 10 µl/ml tritiated thymidine (5-³H-thymidine 120 Ci/mmol; Amersham Biosciences, UK), dan diinkubasi pada suhu 37 °C.

Assay adesi pada mukus. Mukus dari usus manusia diisolasi dari jaringan kolon yang sehat. Mukus manusia dilarutkan (0.5 mg protein/ml) dalam HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanosulphonic acid)-Hanks buffer (HH; 10 mM HEPES, pH 7.4) dan 100 µl larutan

diimobilisasi ke dalam well mikrotiter plate (Maxisorp, Nunc, Denmark) dengan diinkubasi semalaman pada suhu 4 °C. Bakteri dipanen setelah diinkubasi semalaman dan dicuci dua kali dengan buffer HH. Absorbance ($A_{600\text{nm}}$) diatur 0.25 ± 0.05 untuk menstandarkan jumlah bakteri (kira-kira 10^8 CFU/ml) dan 100 μl suspensi ini dimasukkan dalam well dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Selanjutnya well dicuci dua kali dengan menggunakan 200 μl HH untuk menyingkirkan bakteri yang tidak menempel. Bakteri yang menempel dibebaskan dan dilisis dengan 1% (b/v) SDS dalam 0.1 mol/l NaOH (200 μl per well) diinkubasi pada 65 °C selama 1 jam. Isi well dipindahkan ke dalam tabung mikrofug yang mengandung cairan scintillation (OptiPhase 'HiSafe 3'; Wallac, Turku, Finland) dan radioaktivitas diukur dengan cairan scintillation. Adesi atau penempelan dinyatakan dalam persen dari radioaktivitas yang didapatkan kembali setelah adesi relatif terhadap radioaktivitas suspensi bakteri yang ditambahkan ke dalam mukus yang diimobilisasi.

Penghambatan adesi patogen. Untuk menguji kemampuan bakteri asam laktat dalam menghambat adesi bakteri patogen, bakteri probiotik yang tidak dilabel (100 μl , 10^8 CFU/ml) ditambahkan ke dalam well dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Sel bakteri asam laktat yang tidak terikat dicuci dua kali dengan menggunakan buffer HH dua kali, dan bakteri patogen yang diradiolabel (100 μl , 10^8 CFU/ml) ditambahkan ke dalam well dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian, bakteri berlabel yang tidak diikat dicuci dan bakteri yang terikat dibebaskan dan dilisis 1% (b/v) SDS dalam 0.1 M NaOH pada suhu 65 °C selama 1 jam. Radioaktivitas diukur dengan cairan scintillasi. Hasilnya dinyatakan dalam persen radioaktivitas yang dapat diambil kembali setelah adesi, relatif terhadap radioaktivitas suspensi bakteri yang ditambahkan dalam well. Persentasi penghambatan adesi dihitung sebagai perbedaan antara adesi patogen dengan adanya strain bakteri asam laktat dan tanpa strain bakteri asam laktat.

Menggantikan adesi patogen. Kemampuan strain probiotik dalam menggantikan patogen yang sebelumnya beradesi dapat diuji dengan memasukkan radiolabel pathogen dalam well, inkubasikan pada suhu 37 °C selama 1 jam, dan setelah menyingkirkan patogen yang tidak terikat dengan mencuci dua kali menggunakan buffer HH, probiotik yang tidak diradiolabel (100 µl, 10⁸ CFU/ml) ditambahkan ke dalam plate dan diinkubasi pada 37 °C selama 1 jam. Kemudian well dicuci lagi, dan bakteri terikat dibebaskan dan dilisis. Radioaktivitas diukur sebagai perbedaan antara patogen yang menempel sebelum dan setelah penambahan strain bakteri asam laktat.

Kompetisi antara patogen dengan strain bakteri asam laktat. Eksklusi patogen oleh bakteri probiotik dihitung sebagai persen patogen terikat setelah kombinasi dengan bakteri asam laktat relatif terhadap patogen yang terikat tanpa adanya bakteri asam laktat (kontrol).

Untuk uji kompetisi, suspensi 50 % probiotik dan 50 % sel pathogen radiolabel (10⁸ CFU/ml) (1 : 1) ditambahkan ke dalam mukus intestinal (0.5 mg protein/ml) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 120 menit. Setelah 120 menit total reaksi, sel bakteri patogen yang terikat pada mukus disingkirkan dan rasio adesi (%) dihitung. Untuk tiap kondisi, well dengan PBS saja, sebagai pengganti sel non radiolabel adesif disertakan sebagai kontrol dan persen sel patogen terikat dianggap sebagai nilai referensi (0%).

B. ANALISIS STATISTIK

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS 11.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Data dianalisis dengan ANOVA satu arah.

C. HEWAN PERCOBAAN

C.1. Tikus putih Sprague Dawley

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih jantan konvensional *Sprague Dawley*, yang diperoleh dari Balai Penelitian Veteriner, Bogor. Tikus putih *Sprague Dawley* berumur 6 minggu dengan berat badan berkisar antara 99,2 - 103,6 g.

Tikus percobaan ditempatkan pada kandang individu dan diberikan diet normal selama 5 hari selama fase adaptasi, untuk kemudian memasuki fase penelitian selama 7 hari dan dilanjutkan dengan pemberian diet normal selama 3 hari lagi.

Tiga kelompok tikus, yaitu kelompok kontrol, hanya diberi diet normal, kelompok *L. plantarum* strain IS-10506 dan kelompok *L. plantarum* strain IS-20506, yaitu diberi suplementasi probiotik dalam bentuk freeze dried yang dicampurkan ke dalam diet normal yang dipastikan dikonsumsi, dengan dosis $2,5 - 2,8 \times 10^{10}$ cfu per hari

Pengambilan sampel feses untuk uji sekretori IgA, dilakukan pada pagi hari, dengan mengurut bagian ekor dan langsung disimpan dalam tabung ependorf, untuk kemudian disimpan dalam freezer sampai dilakukan pengujian.

C.2. Mencit Balb/c

Hewan percobaan mencit Balb/c diperoleh dari Balai Penelitian Veteriner Bogor. Mencit Balb/c jantan berumur 8-12 minggu dengan berat badan berkisar antara 17-20 gram.

Mencit percobaan ditempatkan pada kandang individu diberikan diet normal selama fase adaptasi (selama 14 x 24 jam) untuk meyakinkan bahwa hewan tersebut tidak berpenyakit atau tidak berpotensi menularkan penyakit. Sebelum mendapatkan perlakuan penelitian, dilakukan skrining dengan beberapa kriteria, yaitu:

1. Kriteria Inklusi:

a. Usia 8-12 minggu.

b. Jenis kelamin jantan.

c. Berat badan 17-20 gram.

2. Kriteria Eksklusi:

5 a. Hewan dinyatakan oleh dokter hewan konsultan terbukti berpenyakit atau cedera fisik dalam kurun waktu evaluasi klinis di dalam kondisi lingkungan yang sesuai (selama 14 x 24 jam).

b. Hewan berperilaku agresif, dalam pengamatan sering menyerang anggota kelompok yang lain.

10 Setelah didapatkan sampel yang homogen melalui skrening dengan kriteria inklusi dan eksklusi di atas, dilakukan pembagian kelompok sampel yang homogen secara alokasi random sehingga setiap anggota sampel mempunyai kesempatan sama untuk menempati kelompok perlakuan, masing-masing 6 ekor
15 mencit.

C. DISAIN PENELITIAN

C1. Hewan percobaan Tikus Putih Sprague Dawley

20 Penelitian dilakukan terhadap 3 kelompok tikus, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus yaitu sebagai berikut:

a_0 : Kelompok Kontrol, diet normal

a_1 : Kelompok probiotik *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dengan dosis 10^{10} cfu per hari

25 a_2 : Kelompok probiotik *Lactobacillus plantarum* strain IS-20506 dengan dosis $2,1 - 2,8 \times 10^{10}$ cfu per hari

30 Setiap hari diberikan probiotik dengan dosis 10^{10} cfu per hari, yaitu 10 mg kultur kering beku yang dicampurkan ke dalam 1 g ransum, untuk dipastikan semuanya dikonsumsi habis. Analisis sekretori IgA tikus dan fekal mikrobiota dilakukan pada 4 titik pengamatan: sebelum perlakuan yaitu setelah masa adaptasi 5 hari di masing-masing kandang dengan diet normal (c_0), setelah 3 hari perlakuan (c_1), pada

akhir perlakuan (7 hari setelah perlakuan) (c_2), dan setelah diberikan diet normal lagi selama 3 hari (c_3).

5 **ANALISIS TOTAL SEKRETORI IgA**

Pada tiap titik pengamatan dilakukan pengujian total sekretori IgA dengan 3 kali ulangan. Metode yang digunakan adalah *Sandwich Elisa*.

10 **1. Pengambilan feses**

Pengambilan sampel feses untuk uji sekretori IgA dan uji fekal mikrobiota, dilakukan pada pagi hari, dengan mengurut bagian ekor dan langsung disimpan dalam tabung endorf, untuk kemudian disimpan dalam anaerobic jar, dan langsung diuji secara mikrobiologis dan biokimia.

15 **2. Isolasi sekretori IgA**

Sekretori IgA disiapkan dengan mengencerkan feses sebanyak 10 kali dengan buffer fosfat (PBS), untuk kemudian disentrifugasi pada 2500 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya dan siap dilakukan pengujian.

20 **3. Analisis Sekretori IgA**

Metode yang digunakan untuk menganalisis jumlah total sekretori IgA adalah *Sandwich ELISA* (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) modifikasi metode Becton Dickinson's ELISA dengan horse radish peroxidase konjugat sebagai berikut :

Dilakukan *coating* pada Maxisorp 96-well microtiter plate (Nunc, USA) yaitu dengan penambahan 100 μ l/well larutan antibodi anti IgA tikus (anti rat IgA) (Sigma, USA) dilarutkan 1 : 1000 dalam buffer karbonat, lalu diinkubasi semalam (10-12 jam) pada suhu ruang, lalu dicuci dengan larutan pencuci (0.05% Tween 20-PBS 0.05 %). Ditambahkan larutan blocking kasein 5% sebanyak 100 μ l/well, diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang, dicuci dengan larutan pencuci (PBS+0.05% tween 20) tiga kali. Ditambahkan 100 μ l/well serum

sampel yang telah diencerkan 100x, diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang, lalu dicuci dengan larutan pencuci (PBS+0.05% tween 20). Ditambahkan 100 μ l/well larutan antibodi anti IgA tikus konjugat enzim, diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang, lalu dicuci dengan larutan pencuci. Ditambahkan 100 μ l/well larutan substrat TMB, diamkan selama 30 menit pada suhu ruang dalam ruang gelap, lalu ditambahkan 100 μ l/well larutan H₂SO₄ 1.25 M sebagai *stopping solution* untuk menghentikan reaksi. Dibaca *Optikal Densitas* (OD) dari tiap well pada *Microtiter plate* dengan menggunakan ELISA reader Multiskan pada 450 nm (Labsystem, Finland). Analisis dilakukan tiga kali ulangan. Untuk pembuatan kurva standar, sampel serum darah tikus kontrol digunakan sebagai standar. Untuk mendapatkan konsentrasi IgA dalam μ g/l optikal optikal densitas (OD) dibandingkan dengan sebelum perlakuan, perlakuan 3 hari, 7 hari dan pemberian diet normal 3 hari.

4. Analisis Fekal Mikrobiota

Analisis mikrobiologi feses tikus dilakukan pada 4 periode pengamatan : sebelum perlakuan yaitu setelah masa adaptasi 5 hari di masing-masing kandang dengan diet normal (c₀), setelah 3 hari perlakuan (c₁), pada akhir perlakuan, 7 hari setelah perlakuan (c₂) dan setelah diberikan diet normal lagi selama 3 hari (c₃). Pada tiap periode pengamatan dilakukan pengujian terhadap total bakteri asam laktat dan total bakteri coliform, masing-masing dengan 3 kali ulangan.

4.a. Analisis total Fekal Bakteri Asam Laktat Metode SPC (STANDARD PLATE COUNT)

Feses ditimbang secara aseptis, dan diencerkan menjadi 10⁻¹ (b/v) dengan PBS steril (pH 6.8), dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Selanjutnya sampel dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam pengencer PBS (dapar fosfat saline) steril (pH 6.8) sebesar 9 ml, dihomogenkan dengan menggunakan vortex sehingga didapatkan pengenceran 10⁻². Demikian selanjutnya dilakukan pengenceran sampai

tingkat pengenceran yang diinginkan. Pemupukan dilakukan dengan menggunakan media MRSA dalam cawan petri. Cawan petri selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C dengan posisi terbalik. Pemupukan dilakukan secara duplo dan perhitungan koloni yang tumbuh dilakukan setelah 48 jam.

4.b. Analisis total Bakteri Coliform Metode SPC

Prosedur yang sama dengan analisis total bakteri asam laktat namun digunakan media VRBA. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam.

ANALISIS STATISTIK

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan Statistica '99 edition. Statsoft. Inc.. Kernel release 5.5.

C.2 Hewan Percobaan Mencit Balb/c

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental. Sampel maupun perlakuan diharapkan terkendali, terukur, dan pengaruh perlakuan dapat lebih dipercaya. Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh informasi mengenai viabilitas bakteri probiotik strain *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (LGG) dan *Lactobacillus plantarum* strain IS 10506 (LIS) dalam saluran cerna hewan percobaan mencit Balb/c. Rancangan penelitian disusun untuk membuktikan bahwa pemberian probiotik LGG dan LIS meningkatkan total viabel bakteri asam laktat dalam feses hewan percobaan mencit Balb/c. Rancangan yang digunakan adalah *Factorial Design*, untuk mengetahui efek kombinasi dua perlakuan pada unit eksperimen dengan pengukuran variabel yang hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan dan memiliki kriteria sebagai berikut: (Pratiknya, 2003; Zainuddin, 1995; Hulley *et al.*, 1988)

1. Pengambilan sampel dilakukan secara acak
2. Ada suatu pengulangan / replikasi
3. Ada kontrol pembanding

K1 : Kelompok mencit yang diberi Probiotik *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (LGG)

K2 : elompok mencit yang diberi Probiotik *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 (LIS)

5 K3 : Kelompok mencit yang diberi Placebo

Dalam proses pelaksanaan penelitian, diberlakukan Kriteria Putus Uji apabila Subyek Penelitian mengalami:

10 1.Efek samping potensial yang berat atau sampai menimbulkan kematian yang mana setelah dilakukan otopsi dinyatakan oleh dokter hewan konsultan bukan oleh karena bahan-bahan perlakuan.

15 2.Cedera yang berat atau sampai menimbulkan kematian karena perkelahian dengan hewan sesama anggota kelompok yang mana setelah dikonfirmasi ke dokter hewan konsultan, penyebab cedera atau kematian tersebut bukan oleh karena bahan-bahan perlakuan.

20 **Analisis total Fekal Bakteri Asam Laktat Metode SPC (STANDARD PLATE COUNT)**

Feses ditimbang secara aseptis, dan diencerkan menjadi 10^{-1} (b/v) dengan PBS steril (pH 6.8), dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Selanjutnya sampel dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam pengencer PBS (dapar fosfat saline) steril (pH 6.8) sebesar 9 ml, dihomogenkan dengan menggunakan vortex sehingga didapatkan pengenceran 10^{-2} . Demikian selanjutnya dilakukan pengenceran sampai tingkat pengenceran yang diinginkan. Pemupukan dilakukan dengan menggunakan media MRSA dalam cawan petri. Cawan petri selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C dengan posisi terbalik. Pemupukan dilakukan secara duplo dan perhitungan koloni yang tumbuh dilakukan setelah 48 jam.

C.3 Uji pada manusia Indonesia

Jenis penelitian yang digunakan adalah *randomized placebo control trial*. Subyek adalah penderita HIV dewasa, dan orang dewasa sehat, dengan memberikan persetujuan untuk ikut serta dalam penelitian dan mengisi inform consent, dan lolos etik diperoleh dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran UI. Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh informasi mengenai viabilitas bakteri probiotik strain *Lactobacillus plantarum* IS 10506 (LIS) dalam feses orang dewasa. Pengambilan sampel feses dilakukan pre - post perlakuan, terhadap 2 kelompok perlakuan yaitu placebo yaitu kelompok yang diberi maltodextrin dalam kapsul, kelompok probiotik, yaitu kelompok yang diberi freeze dried LIS dalam kapsul untuk penderita HIV dan mikroenkapsulasi LIS dan diberikan dalam wadah kapsul no 00, untuk orang dewasa sehat, untuk studi pre-post *randomized placebo controlled double blind trial* dengan dosis $2,6 - 3,2 \times 10^{10}$ cfu per hari. Setiap kelompok terdiri dari 12 orang, dan suplementasi kapsul placebo dan probiotik dilakukan selama 3 minggu.

Rancangan penelitian disusun untuk membuktikan bahwa pemberian probiotik LIS secara kualitatif dapat terdeteksi pada feses orang sehat maupun penderita HIV, dengan identifikasi molekuler menggunakan real time PCR dan menggunakan primer *Lactobacillus plantarum*.

C4. Uji pada anak balita Indonesia

Metode yang dilakukan adalah pre post *randomized placebo double blind controlled trial*. Sebanyak 79 anak balita, 35 anak laki-laki dan 39 anak perempuan berusia 15 - 54 bulan (rata-rata 33 bulan) secara random dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol plasebo (n=41), mendapatkan suplementasi 125 ml susu UHT dengan 1 mg maltodekstrin. Sedangkan kelompok probiotik (n=38) mendapatkan suplementasi susu UHT 125 ml dan 1 mg *Enterococcus faecium* strain IS-27526 yang mengandung $2.31 \times$

10⁸ cfu bakteri hidup setiap hari selama 90 hari oleh bidan desa dari Puskesmas Teluk Naga. Selama suplementasi, subjek tidak mengonsumsi antibiotik dan produk komersial yang mengandung probiotik. Saliva spesimen diambil sebelum dan sesudah suplementasi, untuk diuji sIgA dengan sandwich Elisa. Suplementasi mikroenkapsulasi *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 pada pre post-randomized placebo double blind controlled trial kepada masing-masing 12 anak bawah dua tahun selama 90 hari sejumlah 2,3 x 10¹⁰ cfu bakteri hidup per hari.

D. HASIL PENELITIAN

Tabel 1a. Sekuen nukleotida strain IS-10506 dengan gen 16S rRNA identifikasi molekuler dengan menggunakan PCR

```

1 cgcaangctt ggcggcgatg ccctnactga tnggagttct cnancaacct ctgggtntn
   61 attggtgctt gcttnctgt gtttacatth gagtgagtgg cgaactggtg
agtaacacgt
20   121 gggaaacctg cccagaagcg ggggataaca cctggaaaca gatgctaata
ccgcataaca
   181 acttgccccg catggtccga gcttgaaaga tggcttcggc tatcactth
ggatggtccc
   241 gcggcgatth agctagatgg tggggtaacg gctcaccatg gcaatgatac
25 gtagccgacc
   301 tgagagggta atcgccaca ttgggactga gacacggccc aaactcctac
gggaggcagc
   361 agtagggaat cttccacaat ggacgaaagt ctgatggagc aacgccgct
gagtgaagaa
30   421 gggtttcggc tcgtaaaact ctggtgthaa agaagaacat atctgagagt
aactgthcag
   481 gtattgacgg tatttaacca gaaagccacg gctaactacg tnnccagcag cc

```

35 Sekuens ini menunjukkan 98% homologi dengan sekuens *L. plantarum* yang ada dalam genbank (DQ239698.1; DQ239695.1; AY675256.1; AL935261.1), maka dapat diidentifikasi sebagai *L. plantarum* strain IS-10506 dengan mendapatkan nomor akses genebank DQ860148.

40

Tabel 1b. Sekuens nukleotida strain IS-20506 dengan 16s RNA identifikasi molekuler dengan PCR

1 cgcaacnctgg cggcgtgcct aatcatgcna gtctccncga actctgggta ntgattgggtg
 5 61 cttgcatcat gatttacatt tgagttagtg gcgaaactggg gagtaacacg
 tgggaaacct
 121 gccagaagc gggggataac acctggaaac agatgctaata accgcataac
 aacttgacc
 181 gcatgggtccg agcttgaaag atggcttcg ctatcacttt tggatgggtcc
 cgcgccgtat
 10 241 tagctagatg gtggggtaac ggctcaccat ggcaatgata cgtagccgac
 ctgagaggggt
 301 aatcgccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag
 cagtagggaa
 361 tcttccacaa tggacgaaag tctgatggag caacgccgcg tgagtgaaga
 15 agggtttcg
 421 ctcgtaaac tctgttgta aagaagaaca tatctgagag taactgttca
 ggtattgacg
 481 gtatttaacc agaaagccac ggctaactctg gnnccncc agccaaa

20 Sekuens ini memperlihatkan 97-98% homologi dengan sekuens
L. plantarum yang ada dalam genbank (AB030925.1; DQ239698.1;
 DQ239695.1; AY675256.1; AL935261.1), maka dapat
 diidentifikasi sebagai ***L. plantarum*** strain IS-20506 dan
 mendapatkan nomor akses GeneBank DC860149.

25

Tabel 1c. Sekuens nukleotida *Enterococcus faecium* strain IS-
 27526 dengan 16s RNA identifikasi molekuler dengan PCR

1 ctangggggg ggtcctnant tttccnannc gannaggagn nngttcncc ggaaanngnn
 30 61 nnaaagncga acgggtgagt agcacgtggg taacctgccc atcagaaggg
 gataaacatt
 121 ggaaacaggt gctaataaccg tataacaatc gaaaccgcat ggttttgatt
 tgaaaggcgc
 181 tttcaggtgt cgctgatgga tggacccgcg gtgcattagc tagttgggtga
 35 ggtaacggct
 241 caccaaggcc acgatgcata gccgacctga gagggatgatc ggccacattg
 ggactgagac
 301 acggcccaaa ctctacggg aggcagcagt agggaatctt ctgcaatgga
 cgaaagtctg
 40 361 accgaggacc ctccgctga gtgaagaagg ttttcggatc gtaaaactct
 gtngtnagan
 421 aanaacaggg nngagcagta actganncat cccttgnang nnanctgaac
 caaaaaagnc
 481 tccngnanaa acaaangtgt acattc

45

Sekuens ini memperlihatkan 98 % homologi dengan sekuens *E*
faecium yang ada dalam genbank (DQ239698.1; DQ239695.1;
 AY675256.1; AL935261.1), maka dapat diidentifikasi sebagai
E. faecium strain IS-27526, dan mendapat nomor akses
 50 genebank EP068251.

Bakteri probiotik harus mampu tahan terhadap lisozim dari air liur dan mampu melewati rintangan asam lambung pada pH 2.0 dan garam empedu, dan sudah dibuktikan secara *in vitro* sebagaimana terlihat pada Tabel 2, 3 dan 4. Dengan demikian secara *in vitro* terbukti bahwa strain-strain bakteri asam laktat asal dadih berpotensi sebagai bakteri probiotik, untuk lebih lanjut dibuktikan pada manusia. Tabel 2. Viabilitas Bakteri asam laktat asal dadih terhadap lisozim

BAL	Toleransi terhadap Lysozyme	
	0 jam	1 jam
	(log cfu/ml)	
IS-10285	8.27±0.22	6.64±0.14
IS-7386	8.22± 0.19	7.48±0.18
IS-16183	8.14±0.26	8.11±0.09
IS-20506	8.13± 0.16	6.84±0.05
IS-26958	8.15± 0.09	6.7±0.18
IS-27526	8.3±0.12	4.37±0.11
IS-11857	7.85± 0.13	7.74±0.31
IS-29862	7.97± 0.09	7.11±0.13
IS-10506	8.13±0.14	7.33±0.27
IS-23427	7.97±0.21	7.31±0.16

Nilai merupakan rata-rata dengan standar deviasi dari tiga kali ulangan.

Sel disuspensikan dalam 0.06 M dapar fosfat (pH 6.8) yang ditambah 1 % NaCl yang mengandung 100 µg/ml lisozim, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan kontrol (0 jam).

Tabel 3. Viabilitas bakteri asam laktat asal dadih pada pH rendah

BAL*	Bakteri hidup (log cfu/ml)					
	pH 3.0			pH 2.0		
	0 jam	1 jam	2 jam	0 jam	1 jam	2 jam
IS-10285	8.56±0.02	7.02±0.22	6.04 ± 0.18	7.61±0.18	5.45 ± 0.18	5.35 ± 0.36
IS-7386	9.2±0.05	6.87±0.14	6.22 ± 0.26	9.22±0.16	7.77 ± 0.16	4.83 ± 0.09
IS-16183	8.29±0.12	7.6±0.12	4.3 ± 0.25	7.6±0.21	5.85 ± 0.24	5.22 ± 0.21
IS-20506	7.15±0.23	6.75±0.16	5.76 ± 0.31	7.8±0.16	5.41 ± 0.22	5.15 ± 0.06
IS-26958	7.08±0.09	4.67±0.14	4.3 ± 0.21	7.66±0.21	5.41 ± 0.32	5.21 ± 0.24
IS-27526	6.78±0.13	6.67±0.21	4.67 ± 0.18	7.69±0.34	5.48 ± 0.14	5.35 ± 0.31
IS-11857	8.39±0.07	7.23±0.08	6.39 ± 0.19	7.81±0.16	5.43 ± 0.15	5.4 ± 0.01
IS-29862	8.17±0.09	6.47±0.15	5.98 ± 0.22	7.46±0.12	5.19 ± 0.26	5.42 ± 0.27
IS-10506	8.27±0.02	7.46±0.12	4.22 ± 0.15	7.69±0.21	5.65 ± 0.21	5.22 ± 0.31
IS 23427	8.11±0.19	6.73±0.11	5.66 ± 0.25	7.55±0.12	5.16±0.20	5.49 ± 0.22

Nilai adalah rata-rata dengan standard deviasi dari tiga kali ulangan

5

Tabel 4. Toleransi terhadap garam empedu

BAL*	Bile tolerance ^a
	0.3 % (b/v) oxgall (menit)
IS-10285	0,42
IS-7386	0,9
IS-16183	0,1
IS-20506	11,82
IS-26958	11,52
IS-27526	13,8
IS-11857	16,5
IS-29862	5,03
IS-10506	10,56
IS-23427	11,2

^a lag time : waktu yang dibutuhkan untuk meningkatkan absorbans pada 620 nm dengan 0.3 unit dalam MRS-THIO broth dengan atau tanpa 0.3 % (b/v) oxgall. Perbedaan dalam menit antara kedua kultur media disebut sebagai lag time (LT)

10

15

IS-10285 : *Lc. lactis* subsp. *lactis* IS-10285; IS-7386 : *Lc. lactis* subsp. *lactis* IS-7386; IS-16183 : *Enterococcus faecium* IS-16183; IS-20506 : *L. plantarum* IS-20506; IS-26958 : *L. brevis* IS-26958; IS-27526: *Enterococcus faecium* IS-27526; IS-11857 : *Lc. lactis* subsp. *lactis* IS-11857; IS-29862 : *Lc. lactis* subsp. *lactis* IS-29862; IS-10506 : *L. plantarum* IS-10506; IS-23427: *Enterococcus faecium* IS-23427

TOTAL SEKRETORI IgA

5 Hasil penelitian terhadap pengaruh jenis probiotik terhadap sIgA feses tikus putih Sprague Dauley ditunjukkan dalam Gambar 1 dimana dalam gambar A1 adalah: *L. plantarum* IS-10506 dan A2 adalah *L. plantarum* IS-20506. Dari hasil penelitian ini terlihat jelas bahwa suplementasi *L. plantarum* IS-10506 maupun IS-20506 meningkatkan sIgA pada 10 tikus putih Sprague Dawley setelah suplementasi selama 3 hari, dan meningkat secara nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol, dan setelah 7 hari cenderung menurun untuk kemudian setelah diberi diet normal 3 hari sIgA meningkat lagi secara nyata. Bakteri probiotik *Lactobacillus plantarum* 15 IS-10506 dan IS-20506 terbukti mampu meningkatkan sekretori IgA feses tikus putih Sprague Dawley setelah 3 hari, 7 hari maupun tiga hari setelah berhenti mendapatkan suplementasi bakteri probiotik selama 7 hari.

20 Bakteri probiotik *Enterococcus faecium* strain IS-27526 terbukti meningkatkan sIgA anak balita kurang gizi berat badan kurang dan sangat kurang secara signifikan dibandingkan dengan berat badan normal, namun peningkatan sIgA lebih tinggi pada anak balita berberat badan kurang, 25 yaitu lebih dari 3 kali sedangkan peningkatan pada anak balita berberat badan sangat kurang peningkatannya lebih dari 2 kali setelah diberi suplementasi probiotik dengan dosis 10^8 cfu per hari dalam bentuk kering beku ke dalam susu UHT selama 90 hari.

30 Bakteri probiotik *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 yang dimikroenkapsulasi terbukti meningkatkan sIgA anak bawah dua tahun sehat secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diberi placebo susu skim yang dimikroenkapsulasi setelah 90 hari suplementasi.

KETAHANAN VIABILITAS BAKTERI PROBIOTIK

Suplementasi probiotik *L. plantarum* strain IS-10506 (A1) pada tikus putih Sprague Dawley secara signifikan berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol (A0), setelah 3 hari, fekal bakteri asam laktat meningkat secara signifikan 10,000 kali dibandingkan dengan sebelum suplementasi dan setelah 7 hari suplementasi probiotik dan 3 hari diet normal secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 2).

Sementara itu, profil bakteriologis pasca perlakuan probiotik *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (LGG) dan *Lactobacillus plantarum* strain IS 10506 (LIS) pada mencit Balb/c ditunjukkan dalam Gambar 3, dimana rerata jumlah fekal bakteri asam laktat pasca pemberian perlakuan pada kelompok LGG dan kelompok LIS lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol secara bermakna, masing-masing dengan $p=0,000$ dan $p=0,000$. Sedangkan pada mencit Balb/c dari kelompok kontrol jumlah fekal *Coliform* dan *Eschericia coli* pasca perlakuan tidak berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok LGG dan kelompok LIS.

Bakteri *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan strain IS-20506, masing-masing terbukti tahan terhadap lisozim, kondisi asam pH 2 selama 2 jam, garam empedu, dan fekal mikrobiota bakteri asam laktat baik pada tikus putih Sprague Dawley maupun mencit Balb/c lebih tinggi bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dengan demikian *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan strain IS-20506 memenuhi kriteria persyaratan sebagai bakteri probiotik secara *in vivo*, uji pre klinis.

Bakteri probiotik *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 terbukti mampu beradesi sangat kuat pada mukosa usus manusia (Gambar 4), dibandingkan dengan bakteri asam laktat asal dadih lainnya.

Bakteri probiotik *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 terbukti terdeteksi secara molekuler dengan real time PCR terdapat pada feses orang Indonesia dewasa sehat setelah disuplementasi sebanyak $2,4 - 2,9 \times 10^{10}$ cfu per hari selama

3 minggu, sedangkan pada kelompok kontrol yang disuplementasi dengan kapsul plasebo berisi susu skim yang dimikroenkapsulasi, tidak terdeteksi kandungan *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 pada feses kelompok kontrol.

5 *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 terbukti dapat bertahan, beradesi dan berkolonisasi dalam saluran cerna orang Indonesia dewasa, dan anak bawah dua tahun setelah suplementasi selama 21 hari dengan dosis 10^{10} cfu per hari.

10 *Enterococcus faecium* strain IS-27526 terbukti dapat bertahan, beradesi dan berkolonisasi dalam saluran cerna anak balita Indonesia yang kurang gizi setelah suplementasi selama 90 hari dengan dosis 10^8 cfu per hari, dan meningkatkan sIgA.

15 *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan *Enterococcus faecium* strain IS-27526 terbukti aman dikonsumsi masing-masing pada dosis 10^{10} dan 10^8 cfu per hari masing-masing pada orang dewasa dan anak balita Indonesia, terbukti aman disuplementasikan pada kondisi immuno-compromized subjek, yaitu orang dewasa penderita HIV dan anak balita kurang
20 gizi.

25

30

35

Klaim:

1. Bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 yang mempunyai sekuen nukleotida no. 1 dengan nomor akses genbank DQ860148, strain IS-20506 yang mempunyai sekuen nukleotida no. 2 dengan nomor akses genbank DC860149 dan *Enterococcus faecium* strain IS-27526 yang mempunyai sekuen nukleotida no. 3 dengan nomor akses EP068251 yang bersifat probiotik pada manusia diperoleh dari dadih.
2. Bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* sesuai klaim 1, dimana strain strain IS-10506, IS-20506, *Enterococcus faecium* strain IS-27526, bersifat probiotik pada orang sehat dan anak bawah lima tahun
3. Produk makanan, suplemen, ingredien dan/atau minuman yang mengandung strain bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan strain IS-20506 maupun *Enterococcus faecium* strain IS-27526.
4. Produk makanan, suplemen, ingredien dan/atau minuman sebagaimana yang diklaim dalam klaim 3, dimana dosis strain bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan strain IS-20506 maupun *Enterococcus faecium* strain IS-27526 yang digunakan adalah berkisar dari 10^6 - 10^{16} cfu per ml atau per gram.
5. Produk makanan, suplemen, ingredien dan/atau minuman sebagaimana yang diklaim dalam klaim 3, dimana dosis strain bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan strain IS-20506 maupun *Enterococcus faecium* strain IS-27526 yang digunakan lebih disukai adalah 10^8 - 10^{10} cfu/ml atau cfu/g.
6. Penggunaan bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan strain IS-20506 maupun *Enterococcus*

faecium strain IS-27526 sebagaimana yang diklaim dalam klaim 1 dan 2 untuk pembuatan produk makanan, suplemen, ingredien dan/atau minuman dan aman untuk digunakan sebagai stimulan respon imun dan meningkatkan berat badan dan status gizi anak bawah lima tahun kurang gizi.

5

10

15

20

25

30

35

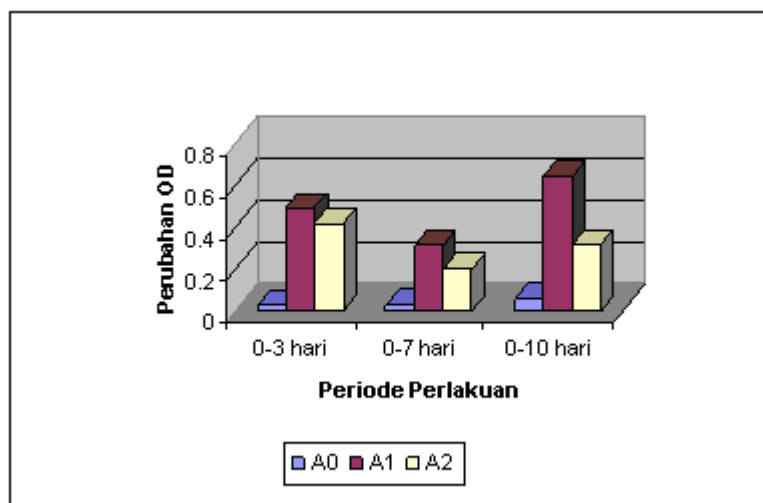
Abstrak**LACTOBACILLUS PLANTARUM STRAIN IS-10506 DAN STRAIN IS-20506,
ENTEROCOCCUS FAECIUM IS-27526 ASAL DADIH BERSIFAT PROBIOTIK**

5

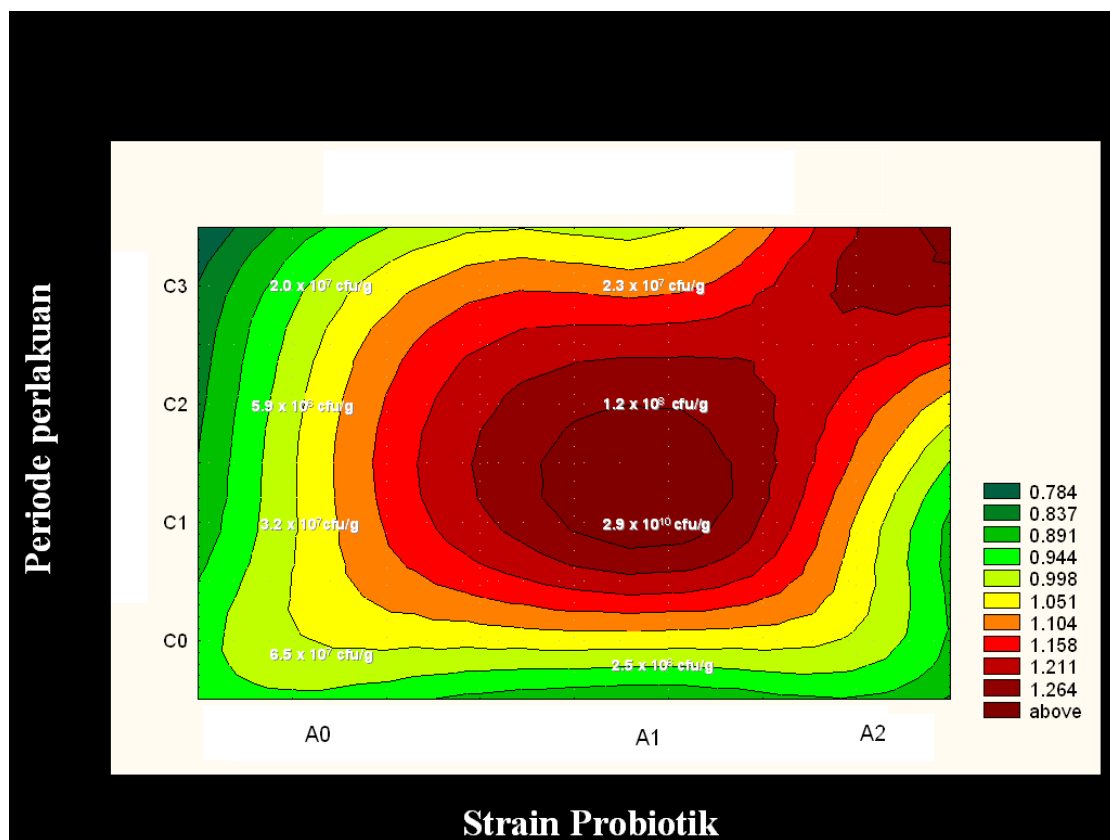
Invensi ini berkenaan dengan strain bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 yang mempunyai sekuen nukleotida no. 1 dengan accession number DQ860148, strain IS-20506 yang mempunyai sekuen nukleotida no. 2 dengan accession no DC860149 dan *Enterococcus faecium* strain IS-27526 yang mempunyai sekuen nukleotida no. 3 dengan accession number EP068251 yang bersifat probiotik diperoleh dari dadih. Strain bakteri ini terbukti mempunyai viabilitas yang tinggi dan tahan terhadap rintangan asam lambung dan garam empedu, dapat menempel, berkolonisasi dan melawan bakteri patogen sehingga dapat meningkatkan sistem imun secara *in vivo*, *Lactobacillus plantarum* strain IS-10506 dan *Enterococcus faecium* strain IS-27526 dapat meningkatkan respon imun pada anak balita Indonesia sehat dan kurang gizi, aman dikonsumsi oleh orang dewasa maupun balita masing-masing pada dosis 10^8 dan 10^{10} cfu per hari diberikan dalam bentuk kering beku maupun mikroenkapsulasi. Invensi juga berkenaan dengan produk makanan, suplemen, ingredien dan/atau minuman yang mengandung strain bakteri probiotik dari invensi ini, metode untuk meningkatkan respon imun dengan strain bakteri probiotik dari invensi ini dan penggunaannya.

30

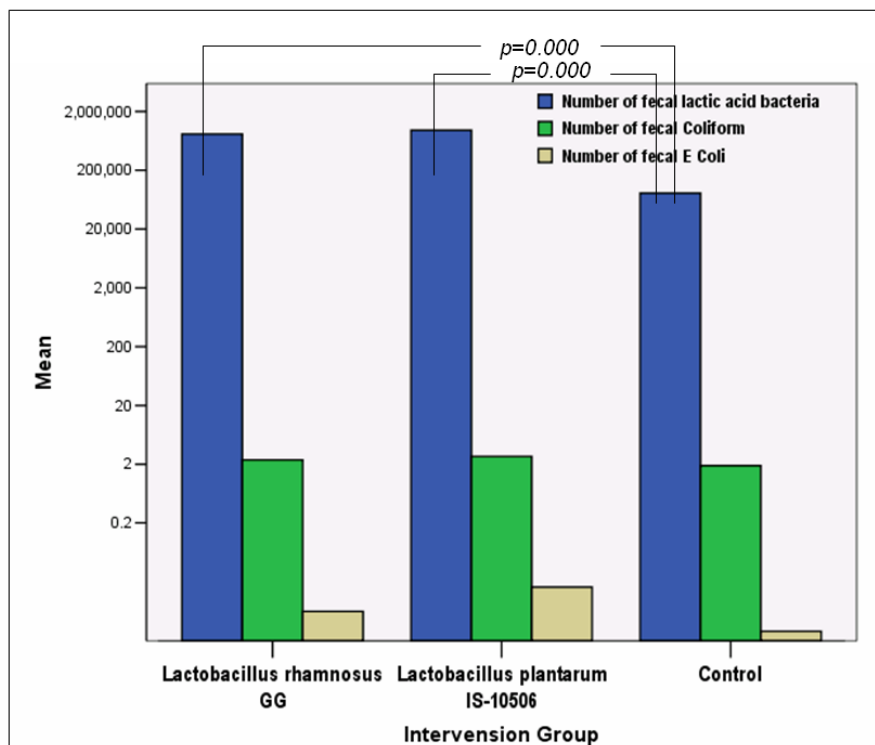
Gambar 1



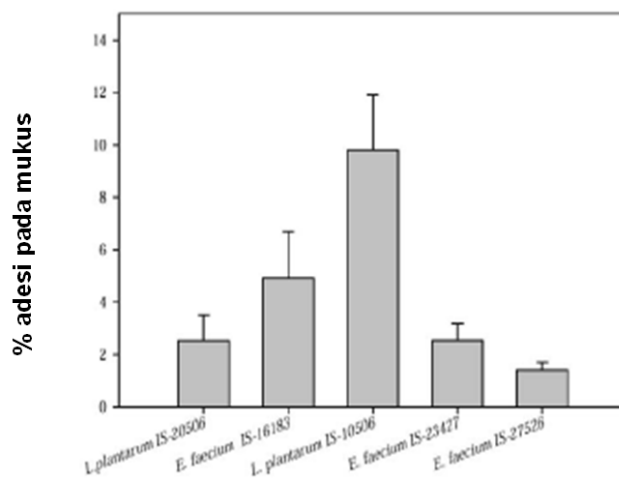
Gambar 2



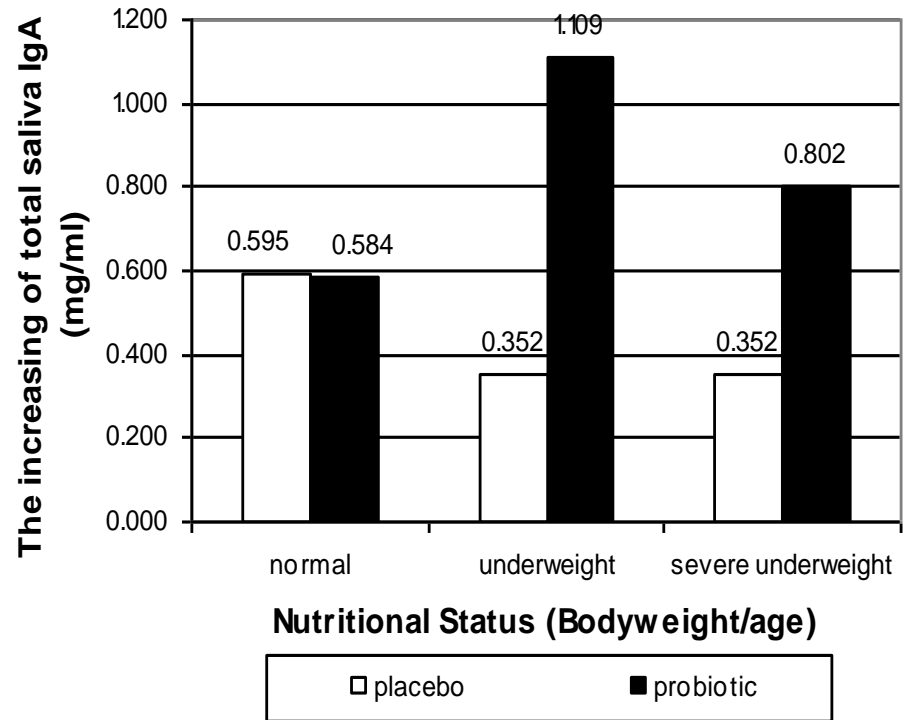
Gambar 3



Gambar 4



Gambar 5



Gambar 6

