

## Kemampuan Metabolisme Asam Linoleat oleh Kandidat Probiotik Potensial Asal Feses Bayi Asli Indonesia

Nosa Septiana Anindita, Muslih Anwar, Widodo, Tiyas Tono Taufiq, Tutik Dwi Wahyuningsih

<sup>1</sup>Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta

<sup>2</sup>BPTBA-LIPI Gunung Kidul

<sup>3</sup>PS-Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada

<sup>4</sup>FMIPA, Universitas Gadjah Mada

E-mail: [anindita.nosa@yahoo.com](mailto:anindita.nosa@yahoo.com)

**Abstract:** Six probiotic candidates were grown overnight at 37 °C in *De Man Rogosa Sharpe*(MRS) *broth* supplemented with 0.4 mg/mL of linoleic acid. The concentrations of the metabolite products in the culture media were determined using GC-MS after extraction and direct transesterification of the fatty acids. Linoleic acid was added to the sample as an internal standard. The result showed that *Lactobacillus casei* strain AP was able to convert free linoleic acid to conjugated linoleic acid in the media more than 60% while five other potential probiotics such as *Lactobacillus casei* AF, *Lactobacillus casei* AG, *Pediococcus acidilactici* AA, *Pediococcus acidilactici* BE and *Pediococcus acidilactici* BK have abilities to convert free linoleic acid to palmitic acid, stearic acid and oleic acid with varying percentages.

**Keywords:** infant faeces; linoleic acid; probiotics

**Abstrak:** Enam isolat kandidat probiotik ditumbuhkan pada *De Man Rogosa Sharpe* (MRS) *broth* yang telah disuplementasi dengan asam linoleat 0,4 mg/ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan ekstraksi lemak. Proses ekstraksi lemak diawali dengan tahap transesterifikasi dilanjutkan dengan analisis melalui GC-MS. Uji kemampuan ke enam kandidat probiotik menunjukkan bahwa isolat probiotik *Lactobacillus casei* strain AP mampu mengkonversi asam linoleat bebas dalam media menjadi CLA >60%. Sedangkan lima isolat kandidat probiotik yaitu *Lactobacillus casei* strain AF, *Lactobacillus casei* strain AG, *Pediococcus acidilactici* strain AA, *Pediococcus acidilactici* strain BE dan *Pediococcus acidilactici* strain BK mengkonversi asam linoleat bebas ke dalam bentuk asam palmitat, asam stearat dan asam oleat dalam konsentrasi yang berbeda-beda.

**Kata kunci:** feses bayi; asam linoleat; probiotik

## PENDAHULUAN

*Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* merupakan mikrobia alami dalam saluran pencernaan. *Lactobacillus* memiliki kemampuan untuk menempel pada sel inang, untuk mengeluarkan atau mengurangi bakteri patogen, dan menghasilkan asam, hidrogen peroksida dan bakteriosin yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Keberadaan *Lactobacillus* dalam saluran pencernaan berpotensi memberikan efek kesehatan bagi inang seperti mencegah terjadinya infeksi saluran pencernaan dan meningkatkan respon imun (Sharma *et al.*, 2005). Probiotik juga terlibat dalam metabolisme lemak, terutama dalam penurunan trigliserida di hati dan peningkatan rantai panjang asam lemak tidak jenuh (*poly unsaturated fatty acids*, PUFA) dan berhubungan dengan penurunan kadar lipoprotein plasma. Modulasiasamamino, metabolisme metilamin dan glikogenesis serta glukoneogenesis juga dilaporkan merupakan efek probiotik (Wells *et al.*, 2010). Mikrobia saluran pencernaan juga dapat memodulasi komposisi asam lemak dalam jaringan hati, otak dan adiposadari *host* melalui sintesis senyawa bioaktif asam lemak seperti CLA (Devillard *et al.*, 2009).

Usus besar merupakan bagian saluran pencernaan yang berperan penting dalam kaitannya dengan keberadaan mikrobia saluran pencernaan. Bakteri dalam saluran pencernaan memetabolisme berbagai substrat yang ada menjadi produk akhir seperti asam lemak rantai pendek dan gas (Gibson dan Fuller, 2000). Sebagai contoh, mikrobia yang berada diusus besar proksimal (bagian kanan) memiliki banyak suplai nutrisi

makanan sehingga tumbuh lebih cepat dan menyebabkan penurunan pH akibat adanya produksi asam lemak rantai pendek (*short chain fatty acid*, SCFA), sedangkan usus besar distal (bagian kiri) ketersediaan nutrisi lebih rendah akibatnya bakteri tumbuh lebih lambat dan pH mendekati netral sehingga tingkat heterogenitas yang tinggi ada pada bagian ini (Gibson dan Roberfroid, 1995).

Asam linoleat (LA) (cis-9, cis-12-18:2) dimetabolisme pada usus besar manusia melalui CLA (terutama isomer cis-9, trans-11-18:2) menjadi asam vaccenat (VA) (trans-11-18:1), kedua senyawa tersebut memiliki manfaat bagi kesehatan, dan selanjutnya menjadi asam stearat (18:0) (McIntosh *et al.*, 2006). Hasil penelitian yang sama juga disampaikan oleh Howard dan Henderson (1999) bahwa produk akhir dari metabolisme asam linoleat oleh campuran mikrobiota pencernaan yaitu asam stearat. Mikroorganisme yang memproduksi stearat dan mengubah *hydroxyl-18:1 fatty acid* (HFA) menjadi CLA, keduanya merupakan proses reaksi penting pada ekosistem dalam usus manusia. Penelitian yang telah dilakukan oleh Devillard *et al.*(2009) menjelaskan bahwa hasil metabolisme asam linoleat oleh mikroflora pada usus besar menunjukkan bahwa asam linoleat dikonversi menjadi asam lemak rantai pendek seperti asam stearate (18:0) dan asam palmitat (16:0) melalui biohidrogenasi. Hasil tersebut diperoleh dari analisis profil asam lemak sampel feses manusia, dimana hasil metabolisme tersebut bervariasi tergantung dari populasi mikroflora saluran pencernaan.

Asam linoleat dapat dikonversi menjadi CLA dengan mengubah posisi ikatan ganda untuk membentuk ikatan ganda dan tunggal yang berselang, sehingga disebut asam linoleat terkonjugasi (Rainer dan Heiss, 2004). Reaksi isomerisasi dari LA dan  $\alpha$ -LNA menjadi isomer CLA and CLNA dikatalisis oleh enzim linoleat isomerase (LAI) (Benjamin dan Spener, 2009; de Carvalho *et al.*, 2010). Linoleat isomerase (EC 5.2.1.5) mengkatalisis isomerisasi asam linoleat menghasilkan CLA. Strain *Lb. plantarum* ZS2058 yang diisolasi dari sayuran terfermentasi mampu mengkonversi asam linoleat menghasilkan CLA dalam jumlah besar (Chen *et al.*, 2012). Widodo *et al.* (2013) juga melakukan identifikasi dan seleksi dari strain *Lactobacillus casei* dalam mensintesis *conjugated linoleic acid* (CLA) dari asam linoleat. Seleksi dari isolat kandidat probiotik menunjukkan bahwa *Lactobacillus casei* strain AP mampu mengkonversi lebih dari 60% asam linoleat bebas dalam media. Sehingga *Lactobacillus casei* strain AP merupakan kandidat potensial probiotik yang dapat diaplikasikan. Widodo *et al.* (2015) menambahkan bahwa susu fermentasi dengan probiotik *Lactobacillus casei* strain AP mampu mereduksi kadar gula darah pada tikus percobaan (*Rattus norvegicus*) selama 15 hari perlakuan.

Menurut Margolles *et al.* (2009) bahwa sumber terbaik untuk isolasi probiotik salah satunya adalah saluran pencernaan manusia. Keunggulan BAL asal saluran pencernaan bagi yang mengkonsumsi ASI memiliki potensi sebagai probiotik, diantaranya resisten terhadap kondisi asam dalam lambung

dan toksisitas garam empedu, kemampuan dalam penghambatan patogen, kemampuan penempelan pada jaringan epitel saluran pencernaan dan mampu memanfaatkan prebiotik, sebagai sumber karbon. Menurut Martin *et al.* (2009), pada awal kelahiran, ketika bayi masih mengkonsumsi air susu ibu (ASI) mikrobial saluran pencernaan yang mendominasi adalah *Bifidobacteria*. Seiring dengan bertambahnya usia, mikrobial yang mendominasi adalah *Firmi-cutes* (termasuk genera *Clostridia* dan bakteri asam laktat) dan *Bacteroides*, sedangkan *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* dan *Verrucomicrobia* terdapat dalam jumlah yang lebih rendah.

Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari feses bayi berumur 7 hari, yang dilakukan oleh Widodo *et al.* (2012) diperoleh 5 strain bakteri akan tetapi baru satu strain yang menunjukkan kemampuannya sebagai kandidat probiotik yaitu *Lactobacillus casei* strain AP. Selanjutnya Widodo *et al.* (2012) dan Anindita *et al.* (2016) melakukan identifikasi untuk mengetahui 5 strain tersebut melalui pola fingerprinting dengan teknik PCR-RFLP. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat AA, BE dan BK berkerabat dekat dengan *Pediococcus acidilactici* sedangkan isolat AP dan AG memiliki hubungan kekerabatan terdekat dengan *Lactobacillus casei*. Dua genus BAL tersebut juga menunjukkan kemampuannya sebagai probiotik dalam ketahanan terhadap pH rendah, garam empedu, perlekatan pada mikus dan digesti prebiotik (Widodo *et al.*, 2014), dua strain kandidat potensial probiotik mampu melakukan degradasi prebiotik pada media

pertumbuhan yaitu *Lactobacillus casei* strain AP dan AG.

Fungsionalitas probiotik dari BAL juga dapat dilihat melalui kemampuan dalam memetabolisme asam lemak. Oleh karena itu, perlu dilakukannya penelitian untuk mengetahui kemampuan isolat kandidat probiotik potensial asal sistem pencernaan manusia dalam memetabolisme asam linoleat. Kemampuan enam isolat tersebut dalam memetabolisme asam linoleat belum diketahui. Dengan demikian studi mengenai hasil metabolisme asam linoleat oleh kandidat probiotik potensial asal feses bayi asli Indonesia penting dilakukan, untuk mendukung fungsionalitas isolat sebagai kandidat probiotik potensial.

Berdasarkan latar belakang dan permasalahan pentingnya studi metabolisme asam linoleat oleh kandidat probiotik potensial asal feses bayi asli Indonesia, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan dari keenam isolat kandidat probiotik potensial asal feses bayi asli Indonesia yang mengkonsumsi ASI dalam memetabolisme asam linoleat.

## METODE PENELITIAN

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *eksperimental laboratory*. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah enam strain kandidat isolat probiotik potensial digunakan pada penelitian ini yaitu *Lactobacillus casei* strain AP, AF dan AG serta *Pediococcus acidilactici* strain AA, BE dan BK yang diperoleh dari penelitian sebelumnya (Widodo *et al.*, 2012). Bahan-bahan penelitian yang berasal dari Merck yaitu *De Man*

*Rogosa Sharpe* (MRS) agar, Tween 80 1%, n-heksana, isopropanol, natrium sulfat, boron trifluorida (BF<sub>3</sub>), sedangkan bahan dari Sigma yaitu *L-cysteine* 0,5 g/L, asam linoleat. Serta gas helium sebagai *carier* pada GC-MS.

Sebelumnya 6 isolat kandidat probiotik potensial dimurnikan dengan ditumbuhkan pada media *De Man Rogosa Sharpe* (MRS) agar disuplementasikan dengan *L-cysteine* 0,5 g/L dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam pada kondisi anaerob fakultatif. Setelah dilakukan proses pemurnian selanjutnya 6 isolat tersebut dilakukan pengujian metabolisme lemak secara *in vitro*.

Media yang digunakan untuk proses metabolisme lemak dalam penelitian ini yaitu *De Man Rogosa Sharpe* (MRS) *broth*. MRS *broth* disuplementasi dengan asam linoleat 0,4 mg/ml (Sigma). Setelah terlebih dahulu dilarutkan dalam larutan Tween 80 1% (v/v). Isolat bakteri diinokulasikan sebanyak 2,5%, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya sebanyak 6 ml sampel disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 30 menit pada suhu 5°C, pelet dibuang dan supernatan dipindah dalam tabung konikal untuk dilakukan analisis CLA (Alonso *et al.*, 2003).

Sebelum dilakukan analisis CLA hasil pengujian metabolisme lemak secara *in vitro* dilakukan ekstraksi lemak terlebih dahulu. Proses ekstraksi lemak pada penelitian ini mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Alonso *et al.* (2003) dengan modifikasi. Sebanyak 6 mL supernatan ditambah dengan 12 mL isopropanol dan dihomogenkan. Selanjutnya dalam campuran tersebut ditambahkan sebanyak 9 mL n-heksan

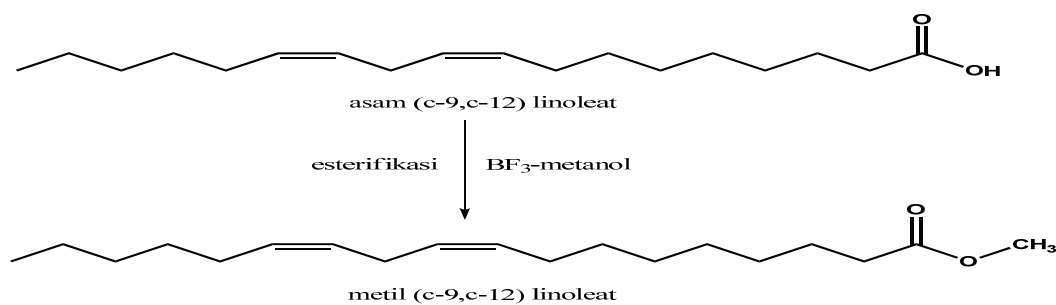
(Merck) dan dilakukan homogenisasi dengan menggunakan vortex selama 3 menit sebelum dilakukan pemisahan berdasarkan masa jenis zat menggunakan sentrifuse pada 2.300 rpm selama 5 menit pada suhu 5°C. Lapisan bagian atas kemudian diambil dan disaring dengan natrium sulfat dan dicuci dengan 7 ml heksana. Fraksi heksana tersebut selanjutnya di uapkan pada suhu ruang (30-40°C). Proses esterifikasi dilakukan dengan cara konsentrat lemak hasil evaporator ditambahkan 300 µL 14% boron trifluorida (BF<sub>3</sub>) (Merck) dalam metanol pada suhu 50 sampai 60°C selama 2 jam. Setelah proses esterifikasi selesai sampel ditambahkan 800 µL heksana, selanjutnya fraksi heksana yang berada pada bagian atas diambil untuk dilakukan analisis menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectra* (GC-MS).

Metil ester lemak dianalisis berdasarkan modifikasi Alonso *et al.*, (2000). Peralatan spesifik yang digunakan yaitu *Gas Chromatography-Mass Spectra* (GCMS, Shimadzu-QP2010S). Analisis dilakukan dengan menggunakan kolom Agilent DB-1 (30 m x 0,25 mm i.d) dengan gas helium sebagai *carier* dan pengion EI 70 Ev. Kondisi yang digunakan yaitu suhu pemanas kolom 80°C, suhu injeksi 310°C, model injeksi split,

tekanan 16,5 kPa, total aliran 40 mL/menit, aliran kolom 0,50 mL/menit dengan split rasio 73. Volume injeksi 1 µl dan puncak diidentifikasi menggunakan perbandingan waktu retensi dan metode *spiking* dengan menambahkan substrat.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Enam isolat probiotik asal feses bayi yaitu *Lb. casei* (strain AF, AP dan AG) dan *P. acidilactici* (strain AA, BE dan BK) diuji lanjut terhadap kemampuan dalam mengkonversi substrat asam linoleat bebas. Media yang digunakan dalam penelitian ini yaitu MRS *broth* dengan suplementasi asam linoleat sebesar 0,4 mg/ml media dengan kondisi inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil fermentasi oleh isolat probiotik tersebut selanjutnya dianalisis dengan menggunakan GC-MS, dengan terlebih dahulu dilakukan derivatisasi melalui reaksi esterifikasi menggunakan boron trifluorida dalam metanol (BF<sub>3</sub>-metanol) (Gambar 1). Proses derivatisasi tersebut mengkonversi asam lemak bebas yang tidak dapat dianalisis menggunakan GC-MS diubah dalam bentuk metil ester dari asam lemak bebasnya. Metil ester inilah yang nantinya dapat dianalisis dengan GC-MS.



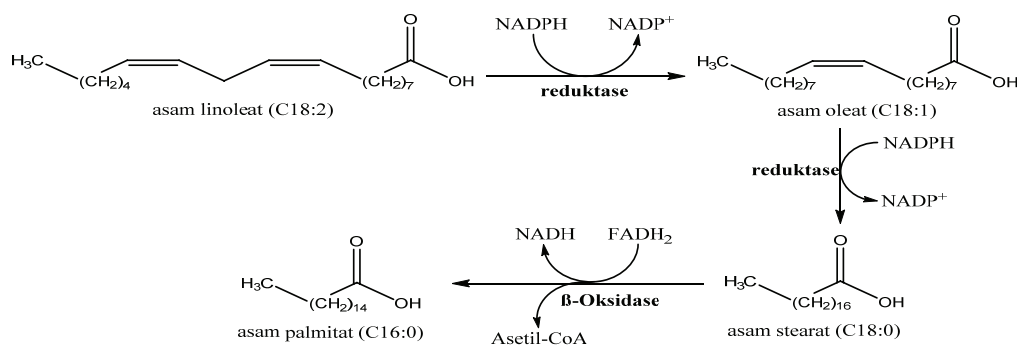
**Gambar 1. Reaksi Esterifikasi Asam Linoleat menjadi Metil Linoleat menggunakan BF<sub>3</sub>Metanol**

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *Lb. casei* strain AP mampu mengkonversi asam linoleat bebas menjadi CLA dengan total konversi CLA sebesar 66,56% (Widodo *et al.*, 2013), sedangkan kelima isolat yang lain hanya mampu merubah substrat asam linoleat menjadi asam lemak yang lain seperti asam oleat, stearat dan palmitat. Proses metabolisme asam lemak menjadi berbagai jenis asam lemak lain memerlukan bantuan enzim yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat, misalnya enzim isomerase yang mampu merubah asam linoleat menjadi asam linoleat yang terkonjugasi dan enzim reduktase mampu mengkonversi asam lemak tak jenuh menjadi asam lemak jenuh.

Menurut Alonso *et al.* (2003) isomer geometris CLA yang terkonversi dari asam linoleat melalui aktivitas bakteri *Lb. casei* dan *Lb. acidophilus* yang diisolasi dari saluran pencernaan manusia adalah *cis-*

*9,trans-11*; *trans-10,cis-12* dan *trans-9,trans-11*. Penelitian yang dilakukan oleh Alonso *et al.* (2003) melaporkan bahwa *Lb. casei* E10 menunjukkan kemampuannya dalam konversi CLA sebesar 80,14% pada media MRS *broth* yang mengandung asam linoleat bebas sebesar 0,2 mg/mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

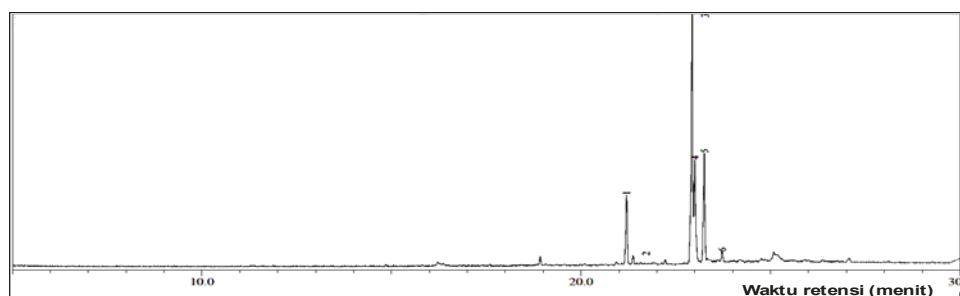
Konversi asam linoleat menjadi asam palmitat melalui beberapa tahapan reaksi yang dikatalisis oleh enzim-enzim yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat (Gambar 2). Asam linoleat (C<sub>18:2</sub>) dapat dikonversi menjadi asam oleat (C<sub>18:1</sub>) dengan bantuan enzim reduktase. Asam oleat dapat mengalami reaksi reduksi lebih lanjut membentuk asam stearat (C<sub>18:0</sub>). Pembentukan asam palmitat (C<sub>16:0</sub>) dari asam stearat dapat terjadi dengan katalis enzim β-oksidase dengan melepaskan satu molekul asetil koenzim A (Harwood, 1988).



**Gambar 2. Konversi Asam Linoleat oleh Isolat Probiotik *Lb. casei* dan *P.acidilactici* menjadi Asam Oleat, Stearat dan Palmitat *Lactobacillus casei* strain AG**

Kromatogram (Gambar 3) hasil fermentasi sampel isolat *Lb. casei* strain AG terdapat 4 puncak utama (nomor 1, 3, 4 dan 5), dengan persentase terbesar pada puncak

nomor 3 (asam linoleat) sebesar 47,05%. Identifikasi masing-masing puncak lebih lanjut dilakukan dengan menggunakan spektra massa.



**Gambar 3. Kromatogram GC-MS Sampel Isolat *Lb. casei* Strain AG**

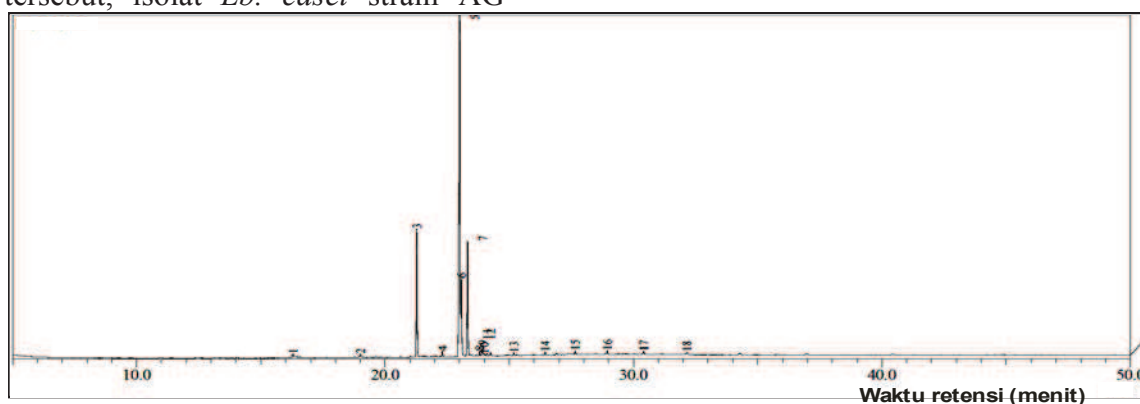
Identifikasi spektra massa didasarkan pada indeks kemiripan (*Similarity Index/SI*) database dari keempat puncak utama terdiri atas puncak nomor 1, yang memiliki ion molekular dengan  $m/z$  sebesar 239 diduga sebagai asam palmitat (12,54%). Puncak nomor 3, dengan  $m/z$  sebesar 263 sebagai asam linoleat (47,05%). Puncak nomor 4, dengan  $m/z$  sebesar 264 diindikasikan sebagai asam oleat (19,02%). Puncak nomor 5, dengan  $m/z$  sebesar 298 sebagai asam stearat (18,56%).

Berdasarkan kromatogram tersebut, isolat *Lb. casei* strain AG

memiliki jumlah enzim  $\beta$ -oksidase lebih sedikit dibandingkan dengan enzim reduktase sehingga proses hidrogenasi (pengubahan ikatan rangkap menjadi ikatan tunggal) lebih dominan dan menghasilkan produk utama asam stearat dan asam oleat.

#### ***Lactobacillus casei* strain AF**

Identifikasi spektra massa dari masing-masing puncak didasarkan pada indeks kemiripan database, dengan  $m/z$  masing-masing puncak analog dengan spektra massa pada isolat *Lb. casei* strain AG.

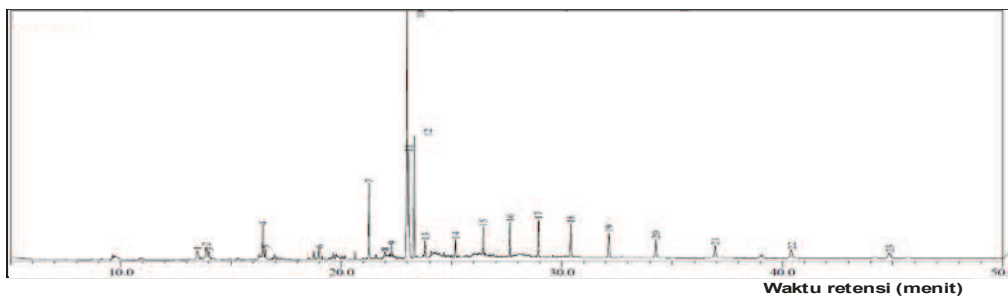


**Gambar 4. Kromatogram GC-MS Sampel Isolat *Lb. casei* Strain AF**

Hasil kromatogram (Gambar 4) menunjukkan terdapat puncak utama yaitu nomor 5 pada waktu retensi (t<sub>R</sub>) 23,00 menit dengan kadar 51,73% yang diindikasikan sebagai asam linoleat yang belum terkonversi. Ketiga puncak lainnya terdiri atas puncak nomor 3 sebagai asam palmitat (16,79%). Puncak nomor 6 sebagai asam oleat (9,42%) dan puncak nomor 7 sebagai asam stearat (15,04%). Berdasarkan hasil tersebut, *Lb. casei* strain AF mempunyai kemampuan  $\beta$  oksidasi asam lemak paling kuat dibandingkan keempat strain lainnya, dimana ikatan 2 atom karbon C dari asam linoleat (C18) diputus menjadi asam palmitat (C16). Selain memiliki kemampuan  $\beta$  oksidasi asam lemak paling kuat, *Lb. casei* strain AF juga memiliki kemampuan hidrogenasi yang kuat, akan tetapi aktivitas enzim lebih dominan pada proses  $\beta$  oksidasi asam lemak dengan produk utamanya asam palmitat.

#### ***Pediococcus acidilacticistrain* AA**

Puncak utama yang muncul dari hasil fermentasi asam linoleat oleh aktivitas isolat *P. Acidilacticistrain* AA diantaranya puncak nomor 7, 10, 11 dan 12. Puncak dengan kadar tertinggi yaitu pada nomor 10 dengan waktu retensi (t<sub>R</sub>) 22,981 menit dan kadar 27,87%. Puncak nomor 10 tersebut diindikasikan merupakan substrat asam linoleat yang belum terkonversi (Gambar 5), yang mengindikasikan, strain ini memiliki kemampuan untuk memetabolisme asam linoleat menjadi asam lemak lain paling besar. Hasil kromatogram tersebut menunjukkan bahwa *P. Acidilacticistrain* AA memiliki kemampuan  $\beta$ -oksidasi lemah dan lebih cenderung pada proses hidrogenasi menghasilkan produk utama asam stearat dan asam oleat, analog dengan kemampuan strain *Lb. casei* strain AG.

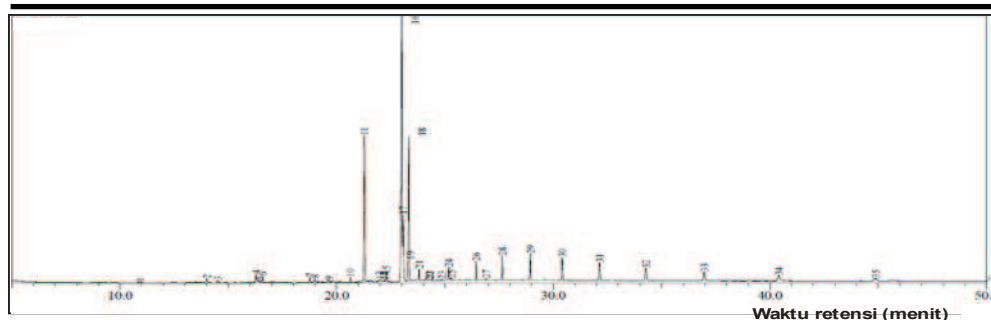


**Gambar 5. Kromatogram GC-MS Sampel Isolat *P. acidilacticistrain* AA  
*Pediococcus acidilacticistrain* BE**

Kromatogram GC-MS (Gambar 6) sampel isolat *P. acidilacticistrain* BE menunjukkan terdapat 4 puncak utama dari hasil fermentasi asam linoleat. Empat puncak utama yaitu puncak nomor 11, 16, 17 dan 18.

Berdasarkan *database* yang ada, puncak nomor 16 merupakan puncak dengan kadar tertinggi sebesar 33,33% dan diduga merupakan substrat yang masih tersisa selama fermentasi yaitu asam linoleat.





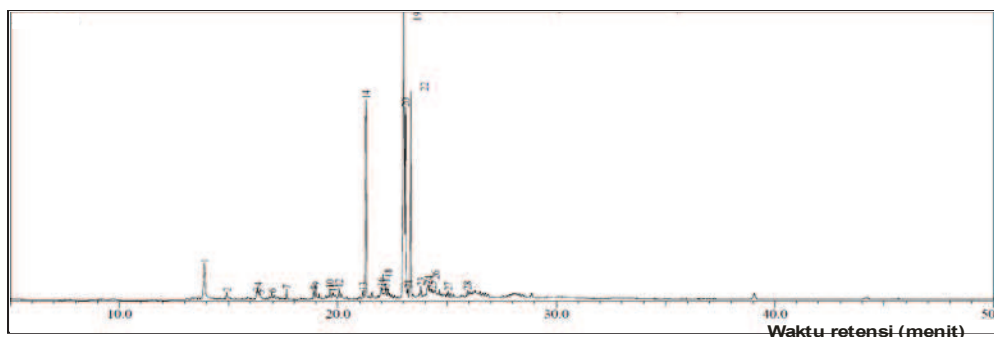
**Gambar 6. Kromatogram GC-MS Sampel Isolat *P. acidilactici* Strain BE**

Selama fermentasi asam linoleat, isolat *P. acidilactici* strain BE mengkonversi asam linoleat menjadi produk berupa asam palmitat sebesar 15,53% (puncak nomor 11), asam oleat sebesar 6,54% (puncak nomor 17) dan asam stearat sebesar 15,22% (puncak nomor 18). Puncak-puncak tersebut menunjukkan bahwa isolat *P. acidilactici* strain BE mempunyai dua macam enzim yaitu  $\beta$ -oksidase dan hidrogenase dengan aktivitas enzim

sama-sama kuat, sehingga mampu mengkonversi asam linoleat menjadi asam palmitat dan asam stearat sebagai produk utama.

#### ***Pediococcus acidilactici* strain BK**

Berdasarkan kromatogram GC-MS (Gambar 7), produk fermentasi dari aktivitas isolat *P. acidilactici* strain BK terdapat empat puncak utama atau senyawa utama yang terbentuk



**Gambar 7. Kromatogram GC-MS Sampel isolat *P. Acidilactici* Strain BK**

Berdasarkan dari database yang tersedia, empat puncak tersebut terdiri atas asam palmitat sebesar 15,98% (puncak nomor 14, m/z 239), asam oleat sebesar 15,16% (puncak nomor 20, m/z 264), asam stearat sebesar 16,99% (puncak nomor 22, m/z 298) dan asam linoleat (puncak nomor 19, m/z 294) yang merupakan substrat yang belum terkonversi sebesar 32,51%. Hasil konversi

tersebut menunjukkan bahwa isolat *P. acidilactici* strain BK mempunyai dua enzim yang sama-sama dominan baik  $\beta$ -oksidase maupun hidrogenase dengan produk konversi yaitu asam palmitat, asam stearat dan asam oleat.

Berdasarkan uraian di atas terlihat bahwa dari kelima isolat probiotik tersebut mempunyai pola kemampuan konversi asam linoleat yang hampir sama. Melalui proses

hidrogenasi, isolat-isolat probiotik tersebut mengkonversi asam linoleat menjadi asam oleat (C<sub>18:1</sub>). Asam stearat (C<sub>18:0</sub>) terbentuk dari proses hidrogenasi asam linoleat menjadi asam lemak jenuhnya. Kelima bakteri probiotik tersebut juga memiliki kemampuan untuk membentuk asam palmitat (C<sub>16:0</sub>) melalui proses hidrogenasi dan pelepasan dua atom C. Isolat-isolat probiotik tersebut menunjukkan kemampuan lain dalam mengkonversi asam linoleat bebas dalam media MRS *broth*.

Kemampuan konversi kelima isolat probiotik dapat dilihat pada Tabel 1 dan reaksi konversi asam linoleat oleh kelima isolat probiotik tersebut dapat dilihat pada Gambar 7. Aktivitas isolat *P. acidilactici* strain BK mampu mengkonversi asam linoleat menjadi asam palmitat (15,98%) dan asam stearat (16,99%) dalam kadar yang lebih tinggi dibandingkan dengan keempat isolat lainnya.

**Tabel 1. Kemampuan Konversi Asam Linoleat oleh Isolat Probiotik Asal Feses Bayi**

Isolat	Kadar produk utama setelah fermentasi (%)			
	Palmitat (C <sub>16:0</sub> )	Stearat (C <sub>18:0</sub> )	Oleat (C <sub>18:1</sub> )	Linoleat (C <sub>18:2</sub> )
<i>Lb. casei</i> strain AF	16,79	15,04	9,42	51,73
<i>Lb. casei</i> strain AG	12,54	18,56	19,02	47,05
<i>P. acidilactici</i> strain AA	7,31	12,59	11,64	27,87
<i>P. acidilactici</i> strain BE	15,53	15,22	6,54	33,33
<i>P. acidilactici</i> strain BK	15,98	16,99	15,16	32,51

Berdasarkan tabel 1, isolat probiotik *P. acidilactici* strain AA memiliki kemampuan tertinggi untuk mengkonversi asam linoleat sebagai substrat menjadi palmitat, stearat, oleat dan asam-asam lemak rantai pendek lainnya. Kemampuan degradasi asam linoleat terendah dimiliki oleh isolat *Lb. casei* strain AF, akan tetapi isolat tersebut memiliki aktivitas enzim hidrogenase sedang dalam mendegradasi asam linoleat menjadi produk asam oleat terbanyak sebesar 19,02% dari kelima strain lainnya.

Kemampuan hidrogenasi kuat dimiliki oleh strain *Lb. casei* strain AG dimana asam linoleat dengan ikatan rangkap menjadi asam stearat yang merupakan ikatan tunggal sebesar 18,56% apabila dibandingkan dengan strain-strain lainnya.

Berdasarkan uraian di atas dapat disimpulkan bahwa kelima strain isolat probiotik yaitu *Lb. casei* (strain AF dan AG) dan *P. acidilactici* (strain AA, BE dan BK) tidak memiliki enzim isomerase sehingga tidak mampu mengkonversi asam linoleat menjadi CLA. Konversi asam linoleat menjadi produk selain CLA juga dilaporkan oleh Panghyova *et al.* (2006) bahwa *Lb. acidophilus* strain La5 mampu mengkonversi 0,2% asam linoleat bebas dalam media MRS *broth* dengan fermentasi selama 24 jam pada suhu 37°C menjadi asam palmitat (<15%), asam stearat (>5%) dan asam oleat (>25%).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Alonso *et al.* (2003), terdapat perbedaan kondisi fermentasi pada jumlah isolat yang

ditambahkan, sehingga perlu dilakukan optimasi terhadap jumlah isolat yang ditambahkan untuk memperoleh nilai konversi yang lebih tinggi.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Hasil metabolisme asam linoleat bebas oleh enam isolat kandidat probiotik potensial asal feses bayi yang mengkonsumsi ASI yaitu *Lactobacillus casei* (strain AP, AF dan AG) dan *Pediococcus acidilactici* (strain AA, BE dan BK) menunjukkan bahwa isolat probiotik *Lactobacillus casei* strain AP mampu mengkonversi asam linoleat bebas dalam media menjadi CLA >60%. Berdasarkan parameter tersebut isolat terpilih *Lactobacillus casei* strain AP memiliki potensi sebagai kandidat probiotik terutama dalam sintesis CLA. Walaupun demikian kelima kandidat probiotik lainnya seperti *Lactobacillus casei* AF, *Lactobacillus casei* strain AG, *Pediococcus acidilactici* strain AA, *Pediococcus acidilactici* strain BE dan *Pediococcus acidilactici* strain BK memiliki kemampuan dalam mengkonversi asam linoleat bebas menjadi asam palmitat, asam stearat dan asam oleat dengan persentase yang bervariasi.

### Saran

Perlu dilakukannya penelitian lanjutan mengenai pengujian isolat kandidat probiotik secara *in vivo*, pengujian bioaktivitas CLA secara *in vivo* dan penentuan struktur isomer CLA berdasarkan standar. Analisis terhadap sekuen genom dari keenam isolat kandidat probiotik potensial sangat perlu untuk dilakukan. Hal tersebut berguna untuk mengetahui

gen yang berperan dalam konversi asam linoleat menjadi CLA dan *short chain fatty acid* (SCFA), merujuk pada enzim-enzim yang berperan. Sehingga membuktikan bahwa isolat tersebut sangat berpotensi untuk dijadikan probiotik unggul dan berimplikasi bagi kesehatan.

## DAFTAR RUJUKAN

- Alonso, L., E.P. Cuesta and S.E. Gilliland. 2003. Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *J. Dairy Sci.*, 86: 1941–1946.
- Anindita, N.S., Widodo., T.T. Taufiq dan T.D. Wahyuningsih. 2016. Identifikasi 16S rRNA *Lactobacillus casei* Kandidat Probiotik Asal Feses Bayi Indonesia Melalui Pola *Fingerprinting* PCR-RFLP. Prosiding Simposium Nasional Teknologi Terapan (SNTT), 4: 331-337. Purwokerto.
- Benjamin, S and F. Spener. 2009. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *J. Nutr. Metabolism*, 6: 36-48.
- Chen, H., B. Yang., S. Gu., B. Zhang., Q. Xu., Q. Ye., Y. Song., Y.Q. Chen., H. Zhang and W. Chen. 2012. Purification and characterization of a linoleate isomerase from *Lactobacillus plantarum* ZS2058. *African J. Biotech*, 11 (20): 4579-4587.
- de Carvalho, E.B.T., I.L.P. de Melo and F.J. Mancini. 2010. Chemical and physiological aspects of isomers of conjugated fatty acids. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos*, 30: 295–307.

- Devillard, E., F.M. McIntosh., D. Paillard., N.A. Thomas., K.J. Shingfield and R.J. Wallace. 2009. Differences between human subjects in the composition of the faecal bacterial community and faecal metabolism of linoleic acid. *J. Micro-biology*, 155: 513–520.
- Gibson, G.R and M.B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr*, 125: 1401-1412.
- Gibson, G.R and R. Fuller. 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J. Nutr*, 130: 391-395.
- Harwood, J.L. 1988. Fatty Acid Metabolism. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol*, 39:101-138.
- Howard, F.A.C and C. Henderson. 1999. Hydrogenation of polyunsaturated fatty acids by human colonic bacteria. *Lett. Appl.Microbiol*, 29: 193–196.
- Margolles, A., B. Mayo and P. Ruas-Madiedo. 2009. Screening, Identification, and Characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains, pp 4–24. In Y.K. Lee and S. Salminen (Eds.) *Handbook of Probiotics and Prebiotics 2<sup>nd</sup> Edition*. Hoboken: John Wiley & Sons Inc.
- Martin, R., E. Jimenez., H. Heilig., L. Fernandez., M.L. Marin., E.G. Zoetendal and J.M. Rodriguez. 2009. Isolation of *Bifidobacteria* from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by pcr-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol*, 75 (4): 965-969.
- McIntosh, F.M., R.J. Wallace and E. Devillard. 2006. Variations in intermediates and products of linoleic acid biohydrogenation by two different human mixed colonic flora. *J. Reprod. Nutr. Dev*, 46(Suppl.1):S52.
- Panghyova, E., D. Kacanova., S. Hajduskova., M. Matulova and E. Kiss. 2006. Influence of free linoleic acid on the fatty acids profile of fermentation by selected probiotic bacteria. *J. Food and Nutr. Research*, 45 (4): 159-165.
- Rainer, L and C.J. Heiss. 2004. Conjugated linoleic acid: Health implications and effects on body composition. *J. Am. Diet Ass*, 104 (6): 963-968.
- Sharma, A.K., P. Mohan and B.B. Nayak. 2005. *Probiotic: Making A Comeback*. Department of Pharmacology Armed Forces Medical College: Pune.
- Wells, J.M., O. Rossi., M. Meijerink and P. van Baarlen. 2010. Microbes and health sackler colloquium: epithelial cross-talk at the microbiota-mucosal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (1): 4607-4614.
- Widodo., N.S. Anindita., T.T. Taufiq and T.D. Wahyuningsih. 2014. Evaluation of Two *Lactobacillus* Strains as Probiotics with Emphasis in Utilizing Prebiotic Inulin as Energy Source. *International Research Journal of Microbiology (IRJM)* (ISSN: 2141-5463), Vol. 5(3): 33-40.
- Widodo., N.S. Anindita., T.T. Taufiq dan T.D. Wahyuningsih. 2013. Identification and Selection of Human Origin *Lactobacillus*

- Strains as Probiotics With Capability in Synthesizing *Conjugated Linoleic Acid* (CLA). Third International Symposium on Probiotics and Prebiotics, Microbiome, Gut-Brain Axis In Health and Disease Mechanism, Function and Regulation. Jakarta.
- Widodo., P.A. Harsita., N.S. Anindita., T.D. Wahyuningsih and A. Nurrochmad. 2015. Selection of Human-origin *Lactobacillus* strains as Probiotics with Capability in Synthesizing *Conjugated Linoleic Acid* and Alleviating Hyperglycemia in Rats (*Rattus norvegicus*) *in vivo*. The 6th International Seminar on Tropical Animal Production Integrated Approach in Developing Sustainable Tropical Animal Production. Yogyakarta. Indonesia.
- Widodo., T. Taufiq., E. Aryati., A. Kurniawati and W. Asmara. 2012. Human Origin *Lactobacillus casei* Isolated from Indonesian Infants Demonstrating Potential Characteristics as Probiotics *in vitro*. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 17 (1): 79-89.
- Widodo., N.S. Anindita., T.T. Taufiq and T.D. Wahyuningsih. 2012. Identification of *Pediococcus* Strains Isolated from Feces of Indonesian Infants With *in vitro* Capability to Consume Prebiotic Inulin and to Adhereon Mucus. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 17 (2): 132-143.