

**Pengaruh Antioksidan Eksopolisakarida dari Tiga Galur Bakteri Asam Laktat pada Sel Darah Domba Terinduksi *tert*-Butil Hidroperoksida (*t*-BHP)  
(Antioxidant Effect of Exopolysaccharide From Three Strains of Lactic Acid Bacteria on Blood Cell of Sheep Induced *tert*-Butyl Hydroperoxide (*t*-BHP)**

**Fifi Afiati<sup>1</sup>, Nina Ainul Widad<sup>2</sup>, & Kusmiati<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Jl Raya Bogor Km 46, Cibinong Bogor 16911

<sup>2</sup> Institut Sains dan Teknologi Nasional - Jl. Moh. Kahfi II, Jagakarsa, Jak-Sel 12640

Email:kusmiati02@yahoo.com

**Memasukkan:** Januari 2015, **Diterima:** April 2015

**ABSTRACT**

Exopolysaccharides (EPS) are water soluble polymers synthesized by three strains of lactic acid bacteria (LAB) namely EPS-S1, EPS-S2 and EPS-S7. Some exopolysaccharides (EPSs) produced by lactic acid bacteria (LAB) present potential health-beneficial properties, such as immune stimulation and antioxidative activities. Antioxidants function in several ways including preventing the formation of radicals, scavenging free radicals, formation of hydrogen peroxide and lipid peroxides. The Objectives of this research were to evaluate the antioxidant activities of exopolysaccharides (EPS) extracts from lactic acid bacteria (LAB). The extracts were investigated by using *in vitro* assays induced *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP) 6 µg.ml<sup>-1</sup> red blood cell (RBC) for their effects on lipid peroxidation malondealdehyde (MDA) level and activities of some antioxidant enzymes which includes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). Six groups consisted of 3 replicated per group; (I) normal control, RBC (II) negative control, RBC+ *t*-BHP (III) positive control, RBC+*t*-BHP+vitamin-C, and (IV-VI) samples, RBC+*t*-BHP+EPS (S1, S2 and S7) extracts. The results showed that exopolysaccharides (EPS) of three strains of lactic acid bacteria (LAB) increased catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzyme activity and decreased malondealdehyde (MDA) content, exopolysaccharides (EPS)-S2 most potential to increase the activity of catalase (CAT; 77.46%) and superoxide dismutase (SOD; 33.87%) enzyme and inhibit the increase malondealdehyde (MDA; 32.19%) levels.

**Keywords:** exopolysaccharide, lactic acid bacteria, malondealdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)

**ABSTRAK**

Eksopolisakarida (EPS) adalah polimer yang larut dalam air, disintesis oleh tiga strain bakteri asam laktat (BAL) yaitu EPS-S1, EPS-S2 dan EPS-S7. Beberapa EPS diproduksi oleh BAL dan berpotensi meningkatkan kesehatan, seperti menstimulasi kekebalan tubuh dan meningkatkan aktivitas antioksidan. Antioksidan juga dapat berfungsi mencegah pembentukan radikal bebas, pembentukan kontrol peroksida dan lipid peroksida. Penelitian bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan eksopolisakarida (EPS) yang dihasilkan dari ekstrak BAL. Ekstrak diuji secara *in vitro* dengan menginduksi *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP) 6 µg.ml<sup>-1</sup> menggunakan sel darah merah (SDM) untuk melihat pengaruh peroksidasi lipid tingkat malondialdehid (MDA) dan kegiatan dari beberapa enzim antioksidan yang meliputi katalase (CAT) dan superoksida dismutase (SOD). Terdapat enam kelompok, yaitu: (I) kontrol normal, sel darah merah (SDM) (II) kontrol negatif, sel darah merah (SDM)+*t*-BHP (III) kontrol positif, sel darah merah (SDM) + *t*-BHP + vitamin-C, dan (IV-VI) sel darah merah (SDM) +*t*-BHP+ekstrak EPS (S1, S2 dan S7). Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksopolisakarida (EPS) dari tiga galur bakteri asam laktat (BAL) dapat meningkatkan aktivitas enzim katalase (CAT) dan enzim superoksida dismutase (SOD) serta dapat menurunkan kadar malondialdehid (MDA) khususnya eksopolisakarida (EPS)-S2 yang paling berpotensi untuk meningkatkan aktifitas enzim katalase (CAT; 77.46%) dan superoksida dismutase (SOD; 33.87%) dan menghambat peningkatan kadar malondealdehyd (MDA; 32,19%).

**Kata Kunci:** eksopolisakarida, bakteri asam laktat, malondealdehyd (MDA), superoksida dismutase dismutase (SOD), katalase (CAT)

**PENDAHULUAN**

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) yang memiliki berat molekul kecil tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan

menjadi parameter penting dalam tubuh, jika spesies oksigen reaktif melebihi jumlah antioksidan di dalam tubuh, maka akan mengakibatkan kerusakan-kerusakan pada komponen lipid, protein, maupun DNA, kondisi ini disebut sebagai stress oksidatif. Senyawa oksigen reaktif (ROS, *Reactive Oxygen Species*) merupakan senyawa

yang sangat reaktif dalam menghasilkan radikal bebas, pada kondisi tertentu sangat dibutuhkan oleh tubuh misalnya untuk membunuh bakteri yang masuk ke dalam tubuh. Oleh sebab itu, keberadaannya harus dikendalikan oleh sistem antioksidan dalam tubuh (Winarsi 2007). Banyak faktor yang dapat menurunkan aktivitas antioksidan enzimatis dalam tubuh sehingga diperlukan asupan tambahan zat antioksidan dari luar tubuh salah satunya yaitu senyawa eksopolisakarida (EPS) dari bakteri asam laktat (BAL) yang diisolasi dari keju dan yogurt. Keju dan yogurt merupakan produk hasil fermentasi susu oleh bakteri asam laktat. Keju merupakan produk olahan susu yang diperoleh dengan cara menggumpalkan susu penuh (*whole milk*), susu skim atau campurannya menggunakan enzim yang terdapat dalam perut hewan ruminansia muda (*rennet*). Yogurt merupakan fermentasi susu oleh bakteri asam laktat yang mempunyai rasa yang khas, tekstur semi padat dan halus, kompak serta rasa asam yang segar (Legowo 2005; Usmiati & Abubakar 2009).

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri Gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk kokus atau batang serta menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir utamanya dalam fermentasi karbohidrat (Axelsson 2004). Beberapa bakteri asam laktat (BAL) menghasilkan eksopolisakarida (EPS) yang berperan membentuk tekstur alami pada industri yogurt, keju dan makanan penutup berbasis susu (Tsuda 2013). Eksopolisakarida (EPS) adalah polisakarida yang disekresikan dari sel, atau diproduksi pada sel terluar oleh enzim ekstraseluler. Eksopolisakarida (EPS) dari bakteri asam laktat (BAL) dapat memberi efek fungsional pada makanan, meningkatkan reologi produk susu fermentasi, dan memiliki efek kesehatan yang menguntungkan. Secara khusus, eksopolisakarida (EPS) bakteri asam laktat (BAL) memiliki aktivitas imunostimulan dan mampu meningkatkan kolonisasi saluran pencernaan oleh bakteri probiotik dan bertindak sebagai antioksidan (Polak *et al.* 2013).

Bisson (2001) menyatakan bahwa bakteri asam laktat (BAL) dapat memproduksi asam organik dan senyawa fenol. Kadar asam laktat yang terus meningkat pada proses fermentasi mampu meningkatkan aktivitas antioksidan.

Asam laktat pada yogurt mengandung  $\alpha$ -hidroxyacids (AHA) yang berfungsi sebagai antioksidan dan sering dimanfaatkan untuk pembuatan kosmetik. Peningkatan aktivitas antioksidan selain oleh asam laktat dapat disebabkan oleh metabolit sekunder hasil metabolisme bakteri. Bakteri probiotik menghasilkan senyawa antioksidan dalam bentuk vitamin C dan vitamin E

Penelitian ini dilakukan untuk menguji potensi antioksidan eksopolisakarida (EPS) bakteri asam laktat (BAL) secara *in vitro* pada darah domba yang diinduksi oleh *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP), senyawa ini merupakan oksidator kuat atau peroksida organik yang mudah terurai membentuk radikal bebas tertier butoksi (*t*-BuO•). Parameter yang diukur adalah kemampuan eksopolisakarida (EPS) dalam meningkatkan aktivitas enzim katalase (CAT) dan enzim superoksida dismutase (SOD) serta menurunkan kadar malondialdehid (MDA).

## BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel yang digunakan sebagai sumber isolat adalah produk fermentasi susu komersial skala industri, yaitu yogurt (EPS-1, EPS-2) dan keju (EPS-7). Sampel diencerkan secara seri pada tabung reaksi berisi larutan garam fisiologis, media selektif MRS (*de Mann Rogossa Sharpe*, Merck) padat dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Isolat bakteri asam laktat (BAL) dikarakterisasi dengan pewarnaan Gram dan divisualisasi di bawah mikroskop (*Leica*) perbesaran 1000x.

Produksi dan ekstraksi eksopolisakarida (EPS) dilakukan menggunakan metode Savadogo *et al.* (2004) dan biomassa yang dihasilkan dikeringkan menggunakan oven vakum pada suhu 50°C selama  $\pm$  2 jam. Karakterisasi senyawa eksopolisakarida (EPS) dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) pada lempeng silika gel GF<sub>254</sub> dengan fase gerak campuran larutan kloroform:metanol:air (7:3:1), kemudian divisualisasi menggunakan sinar UV. Analisis jenis karbohidrat eksopolisakarida (EPS) dilakukan dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) menggunakan kolom Aminex® HPX-87H, (300 mm x 7.8 mm), sedangkan pengujian potensi antioksidan

dilakukan menggunakan plasma darah domba dengan mengukur kadar malondialdehid (MDA) melalui proses sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm, suhu 5°C selama 10 menit, selanjutnya sel darah (SDM) domba digunakan untuk analisis aktivitas enzim katalase (CAT) dan enzim superoksida dismutase (SOD).

Percobaan uji potensi antioksidan ketiga ekstrak eksopolisakarida (EPS)-S<sub>1</sub>, eksopolisakarida (EPS)-S<sub>2</sub> dan eksopolisakarida (EPS)-S<sub>7</sub> dibagi dalam enam kelompok sebagai berikut: Kelompok I: kontrol normal, tanpa penambahan larutan *t*-BHP dan bahan uji, Kelompok II: kontrol negatif, tanpa penambahan bahan uji, Kelompok III : kontrol positif dengan penambahan bahan uji (sel darah merah (SDM) + *t*-BHP 6µg/ml + vitamin C 4 bpj), Kelompok IV: kelompok uji dengan penambahan bahan uji (sel darah merah (SDM) + *t*-BHP 6µg/ml + eksopolisakarida S<sub>1</sub> 50 bpj), Kelompok V: kelompok uji dengan penambahan bahan uji (sel darah merah (SDM) + *t*-BHP 6µg/ml + eksopolisakarida S<sub>2</sub> 50 bpj), Kelompok VI: kelompok uji dengan penambahan bahan uji (sel darah merah (SDM) + *t*-BHP 6µg/ml + eksopolisakarida S<sub>7</sub> 50 bpj

Pengukuran Aktivitas enzim katalase (Aebi 1974). sel darah merah (SDM) domba yang telah ditambah larutan uji dan *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP) diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit, kemudian disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Penurunan serapan dicatat pada 1 240nm. Aktivitas katalase pada suhu 25°C didefinisikan sebagai makromol peroksida H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang dikonsumsi per menit per mL sampel dengan perhitungan sebagai berikut:

Supernatan diekstraksi dengan campuran kloroform-etanol 96 % (3:5), kemudian disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Fase air dicampur dengan dapar (*buffer*) karbonat pH 10.2

Aktivitas katalase (unit/mL) =

$$\frac{[\Delta\text{Abs}/\text{menit} \times 1000]}{43,6 \times \left[ \frac{\text{mL Sampel}}{\text{mL Total}} \right]}$$

dan epineprin 0.02 M . Serapan larutan diukur pada 1 480nm suhu 30°C.

Aktivitas SOD dihitung sebagai berikut:

Plasma darah yang telah ditambah larutan uji dan *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP), diinkubasi pada suhu 25-30°C selama 15 menit kemudian disentrifus pada kecepatan 3000 rpm

% Hambatan =

$$\frac{\Delta\text{Abs} / \text{menit} (\text{blanko}) - \Delta\text{Abs} / \text{menit} (\text{sampel})}{\Delta\text{Abs} / \text{menit} (\text{blanko})} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas SOD (unit / mL)} = \frac{\% \text{Hambatan}}{50\%} \times fp$$

selama 5 menit. Selanjutnya supernatan ditambah trichloroacetic acid (TCA) 20% dan tiobarbiturat (TBA) 0,67%, dipanaskan selama 30 menit pada suhu 95-100°C dan segera didinginkan. Larutan diukur pada 1 532nm (Satoh 1978; Yagi 1984).

Data hasil pengujian dianalisis menggunakan ANOVA, dilanjutkan dengan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

## HASIL

Morfologi sel bakteri asam laktat (BAL) yogurt (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>) dan keju (S<sub>7</sub>) dapat dilihat pada Gambar 1 yang menunjukkan bahwa bakteri asam laktat (BAL) S<sub>1</sub> berbentuk batang rantai, sedangkan bakteri asam laktat (BAL) S<sub>2</sub> dan S<sub>7</sub> berbentuk kokus.

Bobot kering eksopolisakarida (EPS) bakteri asam laktat (BAL) tercantum pada Tabel 1. Karakterisasi eksopolisakarida (EPS) diuji menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk memisahkan senyawa secara cepat menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan pada lempeng kaca atau aluminium. Lempeng kromatografi lapis tipis (KLT) GF<sub>254</sub> mengandung pengikat gipsium dan indikator fluoresensi timah kadmium sulfida/ mangan timah silikat aktif yang berfluoresensi pada 254 nm.

Bercak pada kromatografi lapis tipis (KLT) yang dihasilkan dari senyawa eksopolisakarida (EPS) ketiga sampel dikerok dan dilakukan analisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) untuk melihat komponen gula dalam eksopolisakarida (EPS) bakteri asam laktat (BAL). Pada analisis kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), waktu retensi suatu kromatogram zat uji dibandingkan terhadap waktu retensi kromatogram larutan baku. Puncak kromatogram yang mempunyai luas dan waktu retensi yang sama terhadap baku pembanding pada kondisi percobaan yang sama menjadi indikator tingginya hasil identifikasi (Triyati 1985). Hasil analisis

menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dari masing-masing eksopolisakarida (EPS) S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> dan S<sub>7</sub> dapat dilihat pada Tabel 1.

Pengujian potensi antioksidan eksopolisakarida (EPS) dari bakteri asam laktat (BAL) dapat diamati melalui peningkatan aktivitas enzim katalase dan enzim superoksida dismutase (SOD) serta penurunan kadar malondialdehid (MDA). Hal ini dilakukan pada sel darah yang mengalami stres oksidatif oleh *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP).

**Aktivitas Enzim Katalase**

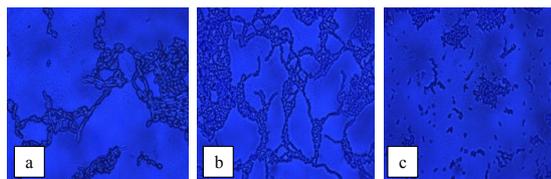
Enzim katalase (CAT) adalah antioksidan endogen yang dapat menangkap dan menguraikan radikal bebas di dalam sel menjadi zat yang kurang reaktif. Enzim katalase (CAT) memiliki peranan penting dalam mengkatalisis hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) menjadi H<sub>2</sub>O dan O<sub>2</sub> serta mencegah pembentukan gelembung CO<sub>2</sub> dalam darah (Zainuri & Wanandi 2012). Hasil pengukuran aktivitas enzim katalase (CAT) dari masing-masing kelompok percobaan dapat dilihat pada Gambar 2.

**Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD)**

Superoksida dismutase (SOD) merupakan enzim yang bekerja dengan cara mengkatalisis reaksi dismutase radikal anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen. Enzim

**Tabel 1.** Bobot Kering dan Jenis Karbohidrat Ek-sopolisakarida (EPS) Bakteri Asam Laktat (BAL)

Parameter EPS	EPS-S1	EPS-S2	EPS-S7
Bobot kering (mg/150 mL)	3,7±0,78	12,67±0,32	9,53±0,31
Kadar Glukosa (bpj)	-	21	-
Kadar Maltoheptaosa (bpj)	84	82	71



**Gambar 1.** Morfologi bakteri asam laktat di bawah mikroskop perbesaran 10 x100 (a) BAL-S1 (b) BAL-S2 (c) BAL-S7

ini memiliki kemampuan dalam menghambat autooksidasi epineprin membentuk adenokrom dalam suasana basa. Aktivitas superoksida dismutase (SOD) dihambat oleh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maka dalam kerjanya superoksida dismutase (SOD) sangat membutuhkan katalase (Winarsi 2007). Hasil pengukuran aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) dari masing-masing kelompok percobaan dapat dilihat pada Gambar 3.

**Kadar Malondialdehid (MDA)**

Malondialdehid (MDA) merupakan metabolit hasil peroksidasi lipid oleh radikal bebas dan merupakan senyawa yang dapat menggambarkan aktivitas radikal bebas di dalam sel sehingga dijadikan sebagai salah satu petunjuk terjadinya stress oksidatif akibat radikal bebas. Stres oksidatif menyebabkan kerusakan oksidatif lipid yang dapat dideteksi dengan peningkatan kadar malondialdehid (MDA) dalam sel (Nielsen *et al.* 1997; Zainuri & Wanandi 2012). Pengukuran kadar malondialdehid (MDA) menggunakan baku pembanding raetoksi propane (TEP) dapat menggambarkan aktivitas radikal bebas di dalam sel. Kurva kalibrasi larutan baku pembanding tetraetoksi propane (TEP) memberikan persamaan garis regresi  $y = 0,095 + 0,470x$  dan koefisien korelasi (r) 0,986 yang berarti ada hubungan linier yang baik antara serapan dengan konsentrasi tetraetoksi propane (TEP). Data hubungan serapan dan konsentrasi baku pembanding tetraetoksi propane (TEP) dapat dilihat pada Gambar 4. Sedangkan hasil analisis kadar malondialdehid (MDA) dari masing-masing kelompok percobaan dapat dilihat pada Gambar 5.

**PEMBAHASAN**

Karakter morfologi sel bakteri asam laktat (BAL) di bawah mikroskop menunjukkan perbedaan yaitu S1 (batang), S2 dan S7 (bulat). Karakterisasi senyawa eksopolisakarida (EPS) dengan kromatografi lapis tipis dari ketiga sampel menghasilkan satu bercak dengan masing-masing nilai *R<sub>f</sub>* sebesar 0,925(S<sub>1</sub>); 0,875 (S<sub>2</sub>); dan 0,8875(S<sub>7</sub>). Hasil kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) pada Tabel 1 memperlihatkan bahwa kromatogram yang muncul dari ketiga sampel eksopolisakarida (EPS) jika dibandingkan dengan

kromatogram baku pembandingan, hasilnya menunjukkan bahwa ketiga sampel S1, S2 dan S7 memiliki kecocokan mengandung senyawa maltoheptaosa. Pada sampel S2 selain maltoheptaosa teridentifikasi juga senyawa glukosa. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan jenis bakteri asam laktat (BAL), menghasilkan ekspolisakarida (EPS) yang berbeda. Bakteri asam laktat S<sub>2</sub> berbeda dari bakteri asam laktat S<sub>1</sub> dan S<sub>7</sub>. Jenis mikroba yang digunakan dalam proses fermentasi dapat mempengaruhi produk akhir yang dihasilkan. Hal ini berkaitan dengan metabolisme mikroba selama proses fermentasi bersifat spesifik, maka setiap produk yang dihasilkan akan lebih spesifik. Demikian pula dalam pembuatan suatu jenis produk fermentasi, perbedaan metode dan kondisi proses akan menghasilkan produk dengan karakteristik yang berbeda (Legowo 2005).

Pengujian antioksidan dilakukan secara in vitro menggunakan sel darah merah (SDM) domba, model ini dipilih karena menghilangkan pengaruh metabolisme xenobiotik oleh hati, karena dilakukan di luar tubuh. Pada sel darah merah (SDM) domba hanya memiliki perangkat metabolisme yang terbatas, sehingga dimungkinkan tidak mampu melakukan metabolisme xenobiotik.

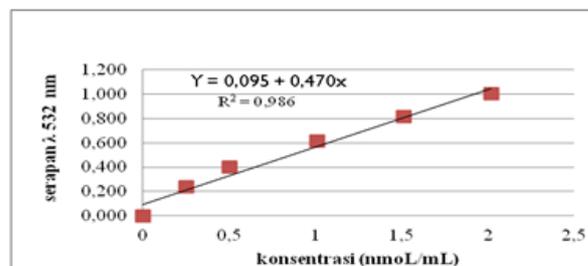
Percobaan menggunakan oksidan *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP) yaitu merupakan oksidator kuat, pada sel darah merah (SDM) dapat menyebabkan penurunan hemoglobin dan membentuk radikal bebas tertier butoksi (*t*-BuO•) yang cepat bereaksi dengan asam lemak tak jenuh dalam sel darah sehingga terjadi peroksidasi lipid yang menyebabkan perubahan struktur membran sel darah merah (SDM) sehingga fluiditas membran yang ditentukan oleh asam lemak tak jenuh menurun.

**Aktivitas Enzim Katalase**

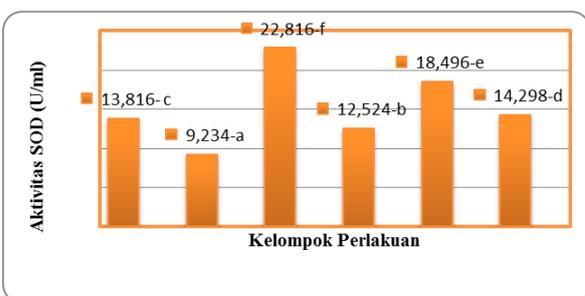
Hasil analisis menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) antara masing-masing kelompok perlakuan, aktivitas enzim katalase (CAT) dari ekspolisakarida (EPS) BAL kelompok perlakuan II berbeda terhadap kelompok perlakuan I, III, IV, V, VI. Histogram pada Gambar 2 menunjukkan bahwa aktivitas enzim katalase (CAT) pada kelompok II lebih rendah jika dibandingkan terhadap kelompok I, hal ini terjadi karena sel darah merah (SDM) domba pada kelompok II telah diinduksi terlebih dahulu oleh oksidan *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP) sehingga katalase yang terkandung dalam sel darah merah (SDM) domba sebagian telah



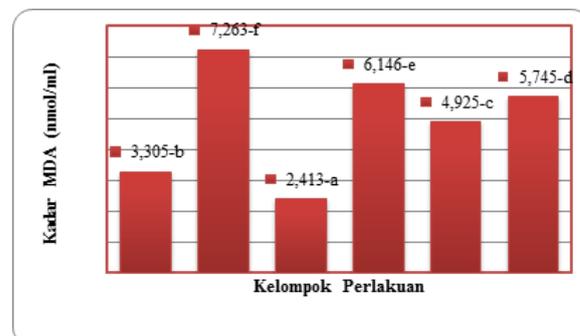
**Gambar 2.** Aktivitas enzim katalase menggunakan spektrofotometer λ 240 nm



**Gambar 4.** Kurva Kalibrasi Baku TEP menggunakan spektrofotometer λ 532 nm



**Gambar 3.** Aktivitas enzim SOD menggunakan Spektrofotometer λ 480 nm



**Gambar 5.** Kadar MDA menggunakan Spektrofotometer pada λ 532 nm

digunakan untuk menetralkan radikal dari *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP) tersebut. Hal ini menyebabkan jumlah katalase (CAT) yang terkandung dalam sel darah merah (SDM) domba menjadi berkurang, sehingga kemampuan untuk menetralkan peroksida  $H_2O_2$  menurun. Pada kelompok III sebelum diinduksi oleh *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP), terlebih dahulu ditambahkan larutan Vitamin C dan pada kelompok IV, V dan VI telah ditambahkan masing-masing larutan uji eksopolisakarida (EPS)  $S_1$ ,  $S_2$  dan  $S_7$  yang diduga sebagai antioksidan. Senyawa eksopolisakarida (EPS) dan vitamin C tersebut bereaksi lebih dahulu dengan oksidan *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP). Kedua senyawa tersebut, yaitu vitamin C dan sampel uji ( $S_1$ ,  $S_2$ , dan  $S_7$ ) bekerja sama dengan katalase (CAT) untuk melawan radikal peroksida  $H_2O_2$  sehingga aktivitas enzim katalase terukur lebih tinggi dari kelompok I dan II.

Pada kelompok III (kontrol positif) peningkatan aktivitas enzim katalase (CAT) terhadap kelompok I (kontrol normal) yaitu sebesar 99,06%, sedangkan pada masing-masing kelompok IV, V dan VI peningkatan aktivitas enzim katalase (CAT) terhadap kelompok I adalah 11,26%; 77,46%; dan 61,50%. Pada kelompok II jika dibandingkan terhadap kelompok I aktivitas enzim katalase (CAT) mengalami penurunan sebesar 47,41%. Penelitian sejenis mengenai proteksi antioksidan terhadap hati dan ginjal tikus yang mengalami stres oksidatif oleh karbon tetra klorida ( $CCL_4$ ) sudah dilakukan oleh Balahoroğlu *et al.* (2008). Kedua organ ini sangat rentan terpapar oleh oksidan yang bersifat endogen maupun eksogen. Antioksidan yang digunakan yaitu vitamin C, melatonin (MLT) dan N-acetylcystein (NAC). Vitamin C dikenal sebagai antioksidan alami yang melindungi sel. Melatonin, merupakan antioksidan yang efektif dan mampu menangkap radikal bebas, melatonin (MLT) berukuran kecil bersifat lipofilik sehingga mudah masuk ke membran biologi dan semua bagian sel. Melatonin mampu melindungi DNA, lipid dan protein terhadap kerusakan oksidatif. N-acetylcystein (NAC) merupakan molekul kecil mengandung golongan thiol bersifat antioksidan untuk menangkap radikal bebas oksigen. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa terapi dengan vitamin C dan terapi secara kombinasi

efektif mencegah stres oksidatif pada hati dan ginjal, sedangkan melatonin (MLT) lebih efektif meningkatkan aktivitas enzim, selanjutnya N-acetylcystein (NAC) lebih efektif mencegah stres oksidatif dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan. Induksi karbon tetra klorida ( $CCL_4$ ) menyebabkan penurunan aktivitas enzim katalase hingga 33,77%, perlakuan antioksidan melatonin (MLT) dapat meningkatkan aktivitas enzim pada hewan coba yang diinduksi karbon tetra klorida ( $CCL_4$ ) hingga 36,21% (Balahoroğlu *et al.* 2008).

### Aktivitas Enzim Superoksida dismutase (SOD)

Enzim superoksida dismutase (SOD) diketahui memiliki kemampuan untuk menghambat autooksidasi spontan dari epineprin menjadi adenokrom. Larutan epineprin akan stabil dalam keadaan suasana asam, tetapi spontan akan teroksidasi dengan adanya kenaikan pH. Autooksidasi terjadi paling cepat disertai dengan terbentuknya adenokrom dengan kecepatan linier yaitu pada pH 10,2 dan suhu 30°C. Di dalam tubuh, dengan adanya penambahan dapar karbonat dalam analisis enzim superoksida dismutase (SOD) dapat menaikkan pH dan menyebabkan suasana menjadi basa, sehingga dapat mempercepat terbentuknya adenokrom.

Hasil analisis menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) antara masing-masing kelompok perlakuan, dimana aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) yang dihasilkan eksopolisakarida (EPS) bakteri asam laktat (BAL) kelompok perlakuan II berbeda terhadap kelompok perlakuan I, III, IV, V, VI. Gambar 3 menunjukkan bahwa pada kelompok II (kontrol negatif) terhadap kelompok I (kontrol normal) mengalami penurunan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) sebesar 33,16%. Hal ini disebabkan karena adanya penambahan oksidan *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP) pada sel darah merah (SDM) domba yang dapat mengkatalisasi autooksidasi epineprin menjadi adenokrom, sehingga aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) dalam menghambat autooksidasi epineprin tersebut menjadi berkurang. Pada kelompok III (kontrol positif) dengan penambahan vitamin C dan kelompok V (kelompok uji), dan VI (kelompok uji) dengan adanya penambahan eksopolisakarida

(EPS) yang diduga sebagai antioksidan pada sel darah merah (SDM) domba sebelum penambahan *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP) dapat menghambat katalisasi autooksidasi epineprin menjadi adenokrom, sehingga aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) terukur lebih tinggi dari kelompok II. Hasil penelitian Balahoroğlu *et al.* (2008), stress oksidatif karbon tetra klorida (CCL<sub>4</sub>) pada hewan coba menyebabkan penurunan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) hingga 32,42%, pemberian melatonin (MLT) mampu meningkatkan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) hingga 93,19% pada hewan coba yang mengalami stress oksidatif.

#### Analisis Kadar Malondialdehid (MDA)

Adanya radikal bebas dalam tubuh ditandai dengan adanya lipid peroksidasi yang dapat menghasilkan produk sekunder berupa malondialdehid (MDA). Malondialdehid (MDA) dapat menggambarkan aktivitas radikal bebas di dalam sel sehingga dijadikan sebagai salah satu petunjuk terjadinya stres oksidatif akibat radikal bebas. Pengukuran malondialdehid (MDA) dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode uji asam tiobarbiturat (TBA) secara spektrofotometri pada 1 532 nm. Larutan tetraetoksiprane digunakan sebagai larutan baku pembanding diperoleh persamaan garis  $Y = 0,095 + 0,470x$  dengan nilai  $r^2 = 0,986$  (Gambar 4).

Hasil menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) antara masing-masing kelompok perlakuan (Gambar 4), dimana analisis kadar malondialdehid (MDA) yang dihasilkan eksopolisakarida (EPS) bakteri asam laktat (BAL) kelompok perlakuan 3 (III) berbeda terhadap kelompok I, II, IV, V, VI. Pada kelompok II kandungan peroksidasi lipid dalam tubuh cukup tinggi, hal tersebut dikarenakan meningkatnya jumlah radikal bebas dengan penambahan *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP) pada sel darah merah (SDM) domba yang dapat menambah terjadinya peroksidasi lipid, sehingga menyebabkan produk kadar malondialdehid (MDA) meningkat. Pada kondisi normal kandungan peroksidasi lipid dalam tubuh cukup rendah yang ditunjukkan pada kelompok I, sedangkan dengan adanya penambahan antioksidan berupa eksopolisakarida (EPS) pada

kelompok IV, V dan VI serta vitamin C pada kelompok III dapat menghambat terjadinya peroksidasi lipid, sehingga mengalami penurunan dalam produksi kadar malondialdehid (MDA). Kadar malondialdehid (MDA) pada kelompok III, IV, V, dan VI masing-masing mengalami penurunan terhadap kelompok II (kontrol negatif) sebesar 66,77%; 15,37%; 32,19%; 20,90%. Pada penelitian menggunakan karbon tetra klorida (CCL<sub>4</sub>) sebagai oksidan mampu meningkatkan kadar malondialdehid (MDA) hingga 95,02%. Hal ini menunjukkan karbon tetra klorida (CCL<sub>4</sub>) sangat reaktif membentuk radikal bebas yang dapat menyebabkan peroksidasi lipid. Stres oksidatif dapat mengganggu sistem metabolisme seluler, perubahan struktur protein dan asam nukleat, kerusakan membran transport ion dan permeabilitas, dan kerusakan sel melalui peroksidasi lipid yang berkaitan dengan proses fisiologi yang abnormal (Szymonic-Lesiuk *et al.* 2003; Cabre *et al.* 2000). Perlakuan Vitamin C sebagai antioksidan terhadap hewan coba yang mengalami stress oksidatif karbon tetra klorida (CCL<sub>4</sub>) mampu menekan kadar malondialdehid (MDA) hingga 44,32%, N-acetylcystein (NAC) menekan hingga 29,39% dan melatonin (MLT) sebesar 12,2% (Balahoroğlu *et al.* 2008).

#### KESIMPULAN

Bakteri asam laktat (BAL) yang diisolasi dari sampel yogurt (S-1, S-2) dan keju (S-7) mampu menghasilkan senyawa eksopolisakarida (EPS). Hasil analisis eksopolisakarida (EPS) dari bakteri asam laktat (BAL) menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) menunjukkan bahwa eksopolisakarida (EPS) dari bakteri asam laktat (BAL) S-1 dan S-7 mengandung komponen maltoheptaosa, sedangkan eksopolisakarida (EPS) dari bakteri asam laktat (BAL) S-2 mengandung glukosa dan maltoheptaosa.

Eksopolisakarida (EPS) bakteri asam laktat (BAL) mampu meningkatkan aktivitas enzim katalase (CAT) dan superoksidismutase (SOD), serta menekan peningkatan kadar malondealdehid (MDA) pada sel darah merah (SDM) domba yang diinduksi oleh oksidan *tersier*-Butilhidroperoksida (*t*-BHP). Peningkatan aktivitas enzim katalase (CAT), enzim superoksida dismutase (SOD) dan penurunan kadar malondealdehid (MDA) yang

paling tinggi ditunjukkan oleh eksopolisakarida (EPS) S2 berturut-turut sebesar 77,46%; 33,87%; dan 32,19%.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Aebi, H. 1974. *Catalase in methods in enzymatic analysis*: Bergmeyer Ed, New York: Academic Press: 674-684.
- Axelsson, L. 2004. *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. 3<sup>rd</sup> Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Balahoroğlu, RHD., H. Özbek, İ. Bayram & MR. Şekeroğlu. 2008. Protective effects Of antioxidants on the experimental liver and kidney. Toxicity In Mice. *European Journal of Genetic and Medical* 5(3):157-164.
- Bisson, L. 2001. *The alcoholic fermentation section 3*. University of California at Davis. University Extension: 91- 92.
- Cabre, M., J. Comps, JL. Paternain, N. Ferre & J. Joven. 2000. Time course of changes in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 27(9): 694-699.
- Legowo, AM. 2005. *Diversifikasi produk olahan dengan bahan baku susu*. Universitas Diponegoro Semarang. 6-11.
- Polak, M., A. Berecka, D. Wasko, Szwajgier & A. Choma. 2013. Bifidogenic and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* E/N cultivated on different carbon sources. *Journal of Microbiology*. 62(2): 181–189.
- Satoh, K. 1978. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 90: 37-43.
- Savadogo, A., A. Cheik, T. Ouattara, WS. Paul, B. Nicolas, SO. Aboubacar & ST. Alfred. 2004. Identification of exopolysaccharides producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *African Journal of Biotechnology* 3(3): 189-194.
- Szymonic-Lesiuk S., G. Chechowska & M. Stryjecka. 2003. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat after carbon tetrachloride intoxication. *Journal of Hepatobiliary Pancreatic Surgery* 10 (4):309-15
- Tsuda, H. 2013. *Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications*. Tokyo: Licensee in Tech. Chapter II.
- Usmiati, S. & Abubakar. 2009. *Teknologi pengolahan susu*. Bogor: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian. 21-23.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan alami dan radikal bebas*. Kanisius. Yogyakarta. 12-211
- Yagi, K. 1984. Assay for blood plasma or serum. *Methods enzymology*. 105: 328-331.