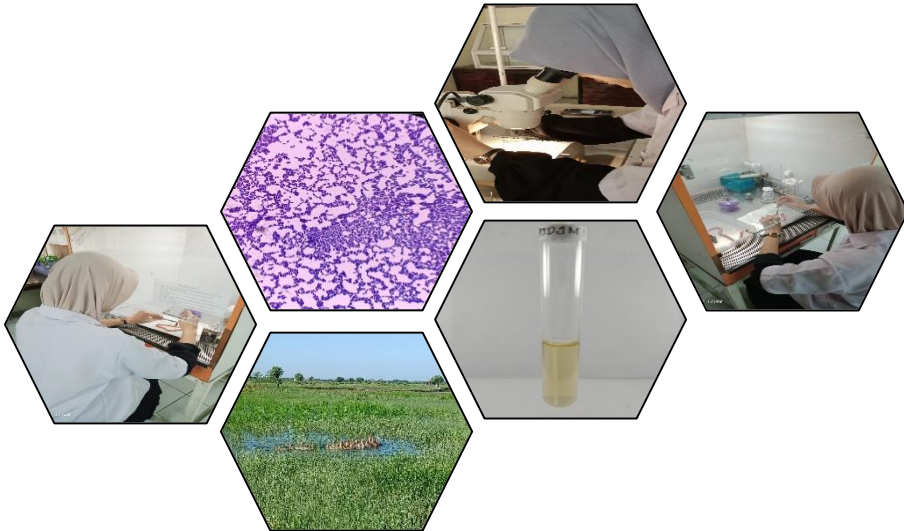


**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PROBIOTIK ASAL USUS ITIK
JANTAN *Anas domesticus* DI DUSUN TAMBUA DESA BONTO
MARANNU KECAMATAN LAU KABUPATEN MAROS**



**DHEA SAGITA
H041 20 1016**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PROBIOTIK ASAL USUS ITIK
JANTAN *Anas domesticus* DI DUSUN TAMBUA DESA BONTO
MARANNU KECAMATAN LAU KABUPATEN MAROS**

**DHEA SAGITA
H041 20 1016**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PROBIOTIK ASAL USUS ITIK
JANTAN *Anas domesticus* DI DUSUN TAMBUA DESA BONTO
MARANNU KECAMATAN LAU KABUPATEN MAROS**

DHEA SAGITA
H041 20 1016

Skripsi

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Biologi

pada

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

SKRIPSI

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PROBIOTIK ASAL USUS ITIK
JANTAN *Anas domesticus* DARI DUSUN TAMBUA DESA BONTO
MARANNU KECAMATAN LAU KABUPATEN MAROS**

DHEA SAGITA
H041 20 1016

Skripsi,

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Biologi pada 15 Agustus
2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

Program Studi Biologi
Departemen Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Utama,

Prof. Dr. Dirayah R Husain, DEA.
NIP. 196005251986012001

Mengelahui:

Ketua Program Studi,

Dr. Magdalena Litaay, M. Sc.
NIP. 196409291989032002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Probiotik Asal Usus Itik Jantan *Anas domesticus* dari Dusun Tambua Desa Bonto Marannu Kecamatan Lau Kabupaten Maros" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing Prof. Dr. Dirayah R Husain, DEA sebagai Pembimbing Utama. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 16 Agustus 2024



UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan berkat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul **Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Probiotik Asal Usus Itik Jantan *Anas domesticus* di Dusun Tambua Desa Bonto Marannu Kecamatan Lau Kabupaten Maros**. Shalawat dan salam senantiasa ditujukan kepada Rasulullah Muhammad SAW yang menjadi teladan terbaik sepanjang zaman. Skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan dan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Selain itu, skripsi ini juga diharapkan dapat memberikan manfaat bagi pembaca dan peneliti lain untuk menambah wawasan dalam bidang biologi khususnya mikrobiologi.

Proses penyusunan dan penyelesaian skripsi ini merupakan rangkaian perjuangan yang panjang bagi penulis. Berbagai hambatan, tantangan, jatuh bangun, suka, dan duka penulis alami dalam penyusunan skripsi ini. Akan tetapi, berkat bantuan, dukungan, dan bimbingan dari berbagai pihak akhirnya skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Penulis menyampaikan penghargaan setinggi-tingginya dan banyak terima kasih kepada Ibu Prof. Dr. Dirayah Rauf Husain, DEA selaku pembimbing utama atas kesediannya yang telah meluangkan banyak waktu, tenaga dan pikiran dalam memberikan bimbingan, motivasi, serta saran kepada Penulis mulai dari awal penyusunan sampai penyelesaian skripsi ini.

Ucapan terima kasih yang tak terhingga pula kepada keluarga tercinta terkhusus kepada kedua orangtua Ayahanda Iskandar, Ibunda Nurmawati, saudara Penulis, Muh. Akmal Malik yang telah memberikan banyak bantuan materil maupun moril, Muh. Fadhil Fahri, Zahra Amalia Putri, Aurel Syafitriani Putri, dan Chentia serta keponakan terkasih Cheryl Azzaira Fahri atas dorongan spirit dan dukungan penuh yang selalu dicurahkan kepada Penulis.

Dengan kerendahan hati, Penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Si., selaku Rektor Universitas Hasanuddin beserta jajarannya.
2. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Sc., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi.
3. Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Penulis mengucapkan terima kasih atas ilmu, masukan, saran dan dukungannya.
4. Bapak Drs. H. Muhtadin Asnady, M.Si selaku Penasehat Akademik (PA) yang senantiasa memberikan bimbingan dari awal masa studi hingga penyusunan skripsi ini dan Ibu Dr. Helmy Widyastuti, M.Si selaku dosen penguji atas saran dan masukan yang diberikan demi kesempurnaan skripsi ini.

5. Bapak/Ibu Dosen Departemen Biologi yang tanpa pamrih dan kenal lelah dalam mengajarkan ilmu pengetahuan.
6. Fuad Gani, S.Si selaku Laboran Mikrobiologi atas bimbingan selama proses penelitian ini.
7. H. Musu dan Hj. Maraming selaku kakek dan nenek Penulis serta Nurhayati, S.Pd selaku tante penulis yang telah merawat dan mendukung penulis sedari kecil.
8. Riska, Ainun Amini, Hayatul Azizah, dan Yosheline Gayatri Appa selaku partner seperjuangan dalam penelitian ini.
9. Sahabat-sahabat Penulis, Najwati Anggraeni, Imam Adryzal, dan Ahmad Amir yang senantiasa memberikan dukungan selama penyusunan skripsi ini.
10. Teman-teman seperjuangan Biologi Angkatan 2020 atas solidaritasnya selama awal masa studi dan terkhusus kepada Sarwan, Doni, Ahmad Nurfakhry Salim, Muhammad Rizal Udin, dan Dzulfaida Rajasa yang telah banyak membantu selama proses penelitian.
11. Seluruh pihak yang telah membantu dan memberikan dukungan yang tidak dapat Penulis sebutkan satu persatu.

Penulis berharap semoga segala kebaikan yang diberikan dari berbagai pihak kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini dapat bernilai ibadah di sisi Allah SWT. Selain itu, besar pula harapan penulis agar skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca dan peneliti lain untuk menambah wawasan dalam bidang biologi khususnya mikrobiologi. Akhir kata, penulis memohon maaf atas kesalahan yang tidak disengaja dalam rangkaian penyusunan skripsi ini.

Makassar, 16 Agustus 2024


Dhea Sagita

ABSTRAK

DHEA SAGITA. Isolasi dan karakterisasi bakteri probiotik asal usus itik jantan *Anas domestica* di dusun tambua desa bonto marannu kecamatan lau kabupaten maros (dibimbing oleh Dirayah Rauf Husain).

Feed additive jenis *Antibiotic Growth Promoter* (AGP) kerap kali digunakan pada pakan untuk meningkatkan produktivitas ternak dan kualitas produksi. Akan tetapi penggunaan AGP berdampak negatif pada kesehatan ternak dan berlanjut ke manusia sehingga penggunaannya mulai dilarang di berbagai negara. *Feed additive* alternatif yang aman untuk ternak adalah pemberian probiotik. Umumnya bakteri probiotik adalah bakteri asam laktat dan dapat ditemukan di usus ternak seperti itik. Pola makan adalah salah satu faktor yang memengaruhi keberadaan mikroflora normal yang ada di dalam usus. Itik yang hidup bebas di daerah persawahan mengakibatkan itik banyak mengonsumsi makanan yang bervariasi. Daerah yang sesuai berdasarkan kriteria ini adalah Dusun Tambua Desa Bonto Marannu Kecamatan Lau Kabupaten Maros. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat dan mengetahui karakterisasi bakteri probiotik asal usus itik Jantan. Karakterisasi berupa pengamatan morfologi koloni dan morfologi sel melalui pewarnaan gram; uji ketahanan terhadap pH, garam empedu, dan suhu; uji biokimia yaitu motilitas, MR, VP, TSIA, dan katalase; dan uji antibakteri terhadap bakteri patogen. Hasil penelitian menunjukkan diperoleh enam isolat yaitu P3DJM1, P3DJM2, P3DJM3, P3DJM4, P3DJM5, dan P3DJM6. Keenam isolat menunjukkan bakteri asam laktat kandidat bakteri probiotik. Isolat P3DJM2, P3DJM3, dan P3DJM6 menunjukkan potensi bakteri probiotik melalui aktivitas antibakteri berupa bakteriostatik pada bakteri patogen.

Kata kunci: feed additive; agp; bal; probiotik, itik; antibakteri.

ABSTRACT

DHEA SAGITA. Isolation and characterization of probiotic bacteria from the intestines of male ducks *Anas domestica* in Tambua hamlet, Bonto Marannu village, Lau sub-district, Maros district (supervised by Dirayah Rauf Husain)

Antibiotic Growth Promoter or AGP-type feed additives are often used in animal feed to enhance livestock productivity and production quality. However, the use of AGPs has negative impacts on animal health and subsequently on human health, leading to its prohibition in various countries. A safe alternative feed additive for livestock is the administration of probiotics. Generally, probiotic bacteria are LAB and can be found in the intestines of livestock such as ducks. Diet is one of the factors influencing the presence of normal microflora in the intestines. Ducks that live freely in paddy fields consume a wide variety of foods. An area that meets this criterion is Dusun Tambua, Bonto Marannu Village, Lau Subdistrict, Maros Regency. This research aims to obtain isolates and determine the characterization of probiotic bacteria from the intestines of male ducks. Characterization includes observation of colony morphology and cell morphology through gram staining; resistance tests to pH, bile salts, and temperature; biochemical tests such as motility, MR, VP, TSIA, and catalase; and antibacterial tests against pathogenic bacteria. The results of the study obtained six isolates, namely P3DJM1, P3DJM2, P3DJM3, P3DJM4, P3DJM5, and P3DJM6. All six isolates showed lactic acid bacteria as candidate probiotic bacteria. Isolates P3DJM2, P3DJM3, and P3DJM6 demonstrated probiotic potential through antibacterial activity in the form of bacteriostatic effects on pathogenic bacteria

Keywords: additive feed; agp; bales; probiotics, duck; antibacterial.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGANTAR.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Teori	3
1.2.1 Tinjauan Umum Itik <i>Anas domesticus</i> dan Sistem Pencernaannya	3
1.2.2 Bakteri Asam Laktat	5
1.2.3 Tinjauan Umum Bakteri Probiotik.....	7
1.2.4 Peranan Probiotik bagi Ternak.....	8
1.2.5 Karakteristik Probiotik.....	9
1.2.6 Mekanisme Kerja Probiotik.....	10
1.2.7 Jenis-jenis Probiotik.....	11
1.3 Tujuan	13
1.4 Manfaat	13
BAB II METODOLOGI PENELITIAN	14
2.1 Tempat dan Waktu.....	14
2.2 Alat dan Bahan.....	14
2.2.1 Alat.....	14
2.2.2 Bahan	14
2.3 Metode Kerja.....	14
2.3.1 Sterilisasi Alat	14
2.3.2 Pembuatan Media	15

2.3.3 Pengambilan Sampel Itik Jantan <i>Anas domesticus</i>	15
2.3.4 Isolasi Bakteri Probiotik	16
2.3.5 Pemurnian Bakteri Asam Laktat	16
2.3.6 Pembuatan Stok Isolat Bakteri Asam Laktat	16
2.3.7 Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri	16
2.3.8 Uji BAL Kandidat Bakteri Probiotik	17
2.3.9 Uji Karakterisasi Biokimia	17
2.3.10 Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri Patogen	18
2.4 Analisis Data	19
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN	20
3.1 Pengambilan Sampel	20
3.2 Isolasi Bakteri Asam Laktat	22
3.3 Pemurnian dan Pembuatan Stok Bakteri Asam Laktat	23
3.4 Pengamatan Morfologi Bakteri Asam Laktat	25
3.4.1 Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Asam Laktat	25
3.4.2 Pengamatan Morfologi Sel dengan Pewarnaan Gram BAL	26
3.5 Uji BAL Kandidat Probiotik	28
3.5.1 Uji Ketahanan Terhadap Asam Lambung (pH)	28
3.5.2 Uji Ketahanan Terhadap Garam Empedu	30
3.5.3 Uji Ketahanan Terhadap Perbedaan Suhu	32
3.6 Uji Biokimia	34
3.6.1 Uji <i>Methyl Red</i> (MR)	34
3.6.2 Uji <i>Voges Proskauer</i> (VP)	35
3.6.3 Uji Motilitas	36
3.6.4 Uji <i>Triple Sugar Iron Agar</i> (TSIA)	37
3.6.5 Uji Katalase	38
3.7 Uji Aktivitas Antibakteri Bakteri Probiotik Terhadap Bakteri Patogen	40
BAB IV PENUTUP	46
4.1 Kesimpulan	46
4.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

Nomor Urut	Halaman
1. Sumber dan produk bakteri asam laktat.....	6
2. Mikroorganisme yang digunakan sebagai probiotik	11
3. Strain probiotik dan produk komersialnya	12
4. Contoh probiotik dan sumbernya pada pencernaan hewan.....	13
5. Kode isolat BAL	24
6. Hasil pengamatan morfologi koloni BAL	25
7. Hasil pengamatan morfologi sel BAL	27
8. Hasil uji ketahanan terhadap asam lambung (pH)	29
9. Hasil uji ketahanan garam empedu 1% dan 5%	31
10. Hasil uji ketahanan BAL pada suhu yang berbeda	33
11. Hasil uji <i>Methyl Red</i> (MR).....	35
12. Hasil uji <i>Voges Proskauer</i> (VP)	36
13. Hasil uji motilitas	37
14. Hasil uji TSIA	38
15. Hasil uji katalase.....	39
16. Diameter zona bening dengan waktu inkubasi 24 jam.....	41
17. Diameter zona bening dengan waktu inkubasi 48 jam.....	42

DAFTAR GAMBAR

Nomor Urut	Halaman
1. Itik <i>Anas domesticus</i>	3
2. Contoh bakteri kelompok BAL	5
3. Mekanisme kerja probiotik	10
4. Lokasi pengambilan sampel	20
5. Itik jantan dan pokok berupa dedak	21
6. Pengambilan <i>intestinum tenue</i> itik jantan	22
7. Hasil isolasi BAL pada media MRSA	23
8. Hasil pemurnian BAL pada media MRSA	24
9. Stok isolat BAL	25
10. Hasil pengamatan morfologi koloni BAL	25
11. Hasil pengamatan morfologi sel BAL	27
12. Pertumbuhan BAL pada media MRSB dengan pH 2,5	29
13. Pertumbuhan BAL pada media MRSB dengan penambahan garam empedu .	31
14. Pertumbuhan BAL pada media MRSB dengan suhu inkubasi yang berbeda ..	33
15. Hasil uji daya hambat isolat bakteri probiotik terhadap bakteri patogen 24 jam	41
16. Hasil uji daya hambat isolat bakteri probiotik terhadap bakteri patogen 48 jam	41

DAFTAR LAMPIRAN

Tabel	Halaman
1. Alur Penelitian.....	58
2. Alur kerja isolasi bakteri probiotik.....	59
3. Proses pengambilan sampel	60
4. Proses isolasi bakteri probiotik.....	60
5. Hasil pemurnian BAL.....	61
6. Morfologi Koloni BAL.....	62
7. Morfologi sel BAL	63
8. Uji Daya Hambat	64

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Seiring dengan bertambahnya jumlah penduduk Indonesia mengakibatkan kebutuhan pangan meningkat pula. Di sisi lain, seiring berjalannya waktu masyarakat semakin sadar akan angka taraf hidup dan pentingnya kebutuhan protein hewani yang menyebabkan permintaan daging yang semakin tinggi. Masyarakat dalam kebutuhannya memenuhi protein hewani memilih untuk mengonsumsi protein dari sapi, kambing, maupun ayam. Data menunjukkan konsumsi daging sapi pada tahun 2022 mencapai 627.952 ton jauh melebihi produksi dalam negeri 413.669 ton (BPS, 2023). Rendahnya produksi dalam negeri disebabkan karena berbagai hal seperti biaya produksi yang tinggi, penyakit pada ternak, dan pertumbuhan ternak rendah. Hal ini menyebabkan Indonesia masih terus melakukan impor daging sapi (Heatubun dan Matatula, 2023). Meskipun demikian, produksi dan impor daging masih belum dapat memenuhi permintaan masyarakat. Dalam mengatasi hal ini, pemerintah dan peternak saling berkolaborasi untuk memenuhi permintaan masyarakat dengan meningkatkan produksi salah satunya dengan memperhatikan pakan ternak.

Pakan memiliki peranan penting bagi ternak, baik untuk pertumbuhan ternak muda maupun untuk mempertahankan hidup dan menghasilkan produk (susu, telur, daging). Fungsi dari pakan adalah memelihara daya tahan tubuh dan kesehatan. Agar ternak tumbuh sesuai dengan yang diharapkan, jenis pakan yang diberikan pada ternak harus bermutu baik dan dalam jumlah cukup. Dalam rangka meningkatkan penampilan produksi ternak unggas khususnya ayam broiler adalah dengan penambahan *feed additive* dalam pakan. *Feed additive* adalah bahan pakan tambahan yang diberikan pada ternak dengan tujuan untuk meningkatkan produktivitas ternak maupun kualitas produksi (Murwani *et al.*, 2002).

Jenis *feed additive* yang kerap kali digunakan adalah AGP (*Antibiotic Growth Promoter*). Penggunaan AGP dalam pakan ternak mempunyai efek dalam meningkatkan performa ternak seperti penambahan bobot badan, efisiensi penggunaan pakan dan mengurangi tingkat kematian. Namun, penggunaan AGP berdampak untuk kesehatan dan berpengaruh terhadap ekonomi dan lingkungan. Penggunaannya dalam pakan berpengaruh terhadap resistensi bakteri dalam tubuh ternak dan berlanjut ke manusia sehingga penggunaan AGP sudah mulai dilarang di berbagai negara (Prasetyo *et al.*, 2020). Dengan demikian, diperlukan *feed additive* alternatif yang aman untuk ternak. Salah satu *feed additive* alternatif yang dapat digunakan untuk mencapai produktivitas yang optimal dan efisien adalah dengan pemberian probiotik. Secara umum probiotik didefinisikan sebagai sebuah produk mikroba hidup yang digunakan sebagai suplemen dan dapat menguntungkan inangnya dengan meningkatkan keseimbangan mikrobial pencernaannya (Majid *et al.*, 2022). Beberapa probiotik diketahui dapat menghasilkan enzim pencernaan seperti amilase, protease dan lipase yang dapat meningkatkan konsentrasi enzim pencernaan pada saluran pencernaan inang sehingga dapat meningkatkan perombakan nutrien. Penggunaan probiotik ditujukan untuk menstabilkan mikroflora

pencernaan dan berkompetisi dengan bakteri patogen sehingga strain probiotik harus mencapai usus dalam keadaan hidup dan dalam jumlah yang cukup serta mampu meningkatkan perombakan nutrisi (Zurmiati *et al.*, 2014).

Pemberian probiotik memberikan efek menguntungkan seperti pengurangan kemampuan mikroorganisme patogen dalam memproduksi toksin, menstimuli enzim pencernaan serta dihasilkannya vitamin dan substansi antimikrobal sehingga meningkatkan status kesehatan inang. Keuntungan lain dari penggunaan probiotik adalah dapat mengurangi tekanan negatif yang diakibatkan adanya hambatan pakan (berupa anti nutrisi) pada pakan. Hal ini dikarenakan probiotik mampu menstimulasi peningkatan ketersediaan zat gizi bagi inang. Probiotik mampu meningkatkan produktivitas ternak dengan mekanisme: melekat/menempel dan berkolonisasi dalam saluran pencernaan, berkompetisi dengan mikrobi patogen dengan memproduksi zat anti mikroba patogen dan meningkatkan sistem kekebalan inang (Sumarsih *et al.*, 2012).

Probiotik dapat berupa satu atau beberapa jenis mikroorganisme (mikroorganisme tunggal atau kultur campuran). Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan salah satu kelompok bakteri yang banyak digunakan sebagai bakteri probiotik, akan tetapi tidak semua BAL termasuk sebagai bakteri probiotik (Permadi *et al.*, 2018). Meskipun demikian, kebanyakan bakteri probiotik berasal dari kelompok bakteri asam laktat (BAL). BAL adalah kelompok bakteri yang menghasilkan asam laktat sebagai produk utamanya. Beberapa spesies dari kelompok bakteri asam laktat terutama dari genera *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* telah dikarakterisasi sebagai probiotik. Bakteri asam laktat merupakan kelompok besar mikroorganisme yang menghasilkan asam laktat sebagai metabolit utama. Kelompok ini secara alami terdapat pada banyak bahan pangan serta saluran gastrointestinal dan urogenital manusia dan hewan (Aritonang *et al.*, 2019). Selama pertumbuhannya, bakteri asam laktat dapat memproduksi komponen metabolit, seperti asam organik, hidrogen peroksida, bakteriosin, dan komponen lainnya. Bakteriosin merupakan suatu péptida antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat selama fase pertumbuhan eksponensial yang dalam jumlah yang cukup dapat membunuh atau menghambat bakteri lain yang berkompetisi dalam ekologi yang sama (Vasiljevic dan Shah, 2008).

Bakteri asam laktat hidup pada saluran pencernaan ternak. BAL dapat diperoleh dengan memanfaatkan berbagai sumber yang mampu menghasilkan bakteri asam laktat salah satunya yaitu saluran pencernaan ternak. Saluran pencernaan adalah salah satu sumber terbesar ditemukannya bakteri kelompok BAL. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa BAL dapat ditemukan pada saluran pencernaan berbagai hewan ternak salah satunya yaitu pada usus ayam dan usus itik. Penelitian yang dilakukan oleh Husain *et al.* (2020) mendapatkan isolat Bakteri *Bacillus subtilis* dari usus ayam kampung *Gallus domesticus*. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Nurhikmayani *et al.* (2015) menunjukkan bahwa terdapat bakteri *Enterococcus faecalis* dan *Lactobacillus paraplantarum* yang diisolasi dari usus itik pedaging *Anas domesticus*.

Itik merupakan salah satu hewan ternak yang tergolong unggas dan memiliki daya tahan hidup yang cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan unggas lainnya

meskipun lingkungan hidup itik tidak membutuhkan kondisi tertentu bahkan pada lingkungan kotor sekalipun. Selain itu, makanan itik bervariasi mulai dari rumput, tanaman air, ikan, serangga, cacing, bahkan sisa-sisa makanan rumah tangga. Meskipun demikian, itik tetap memiliki daya tahan hidup yang tinggi. Fenomena ini menjadi dasar dilakukannya penelitian ini untuk mendapatkan informasi tentang karakteristik bakteri asam laktat yang terlibat (terdapat) di dalam saluran pencernaan itik yang kemungkinan turut mendukung menyebabkan tingginya daya tahan itik.

Sampel itik yang digunakan pada penelitian ini berasal di Dusun Tambua Desa Bonto Marannu Kecamatan Lau Kabupaten Maros. Daerah ini adalah daerah persawahan yang luas sehingga memungkinkan itik untuk mencari makan di daerah tersebut. Kriteria itik yang digunakan adalah itik yang dilepaskan bebas oleh warga yang tinggal di sekitar persawahan. Selain itu, makanan yang dikonsumsi oleh itik ini bukan hanya dedak yang merupakan pakan itik pada umumnya melainkan juga sisa makanan rumah tangga seperti kepala udang, sisa ikan, dan olahan rumah tangga lainnya. Pemilihan dan penetapan sumber itik berdasarkan habitatnya bertujuan untuk mengetahui pengaruh makanan yang dikonsumsi itik terhadap keberadaan bakteri yang berpotensi sebagai probiotik di saluran pencernaannya. Penelitian dari Wakhid (2013) menyatakan bahwa itik jantan cenderung memiliki pertumbuhan yang lebih cepat dan mencapai bobot tinggi dibandingkan dengan itik betina. Selain itu, jangkauan area itik jantan dalam mencari makan lebih luas sehingga mempengaruhi penyerapan energi pada itik jantan. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukanlah penelitian ini untuk memperoleh isolat dan mengetahui karakteristik bakteri probiotik asal usus itik jantan *Anas domesticus* di Dusun Tambua Desa Bonto Marannu Kecamatan Lau Kabupaten Maros.

1.2 Teori

1.2.1 Tinjauan Umum Itik *Anas domesticus* dan Sistem Pencernaannya



Gambar 1. Itik *Anas domesticus* (Sumber: Shutterstock.com dan Dreamstime.com)

Itik (*Anas domesticus*) merupakan salah satu komoditas unggas yang banyak diminati sebagai alternatif usaha peternakan unggas. Saat ini, semakin banyak masyarakat yang memilih untuk memelihara itik. Itik adalah salah satu jenis

unggas yang potensial sebagai penghasil telur. Dalam satu tahun itik dapat memproduksi telur sekitar 250-300 butir, dan berat rata-rata 60-70 gram per butir. Selain telur itik yang bernilai jual tinggi, daging itik pun bernilai ekonomis terutama keterkaitannya dengan kuliner daerah. Perkembangan peternakan itik terus meningkat karena itik memiliki sifat yang mudah dalam pemeliharaan, kuat dalam serangan penyakit, dan mudah dalam beradaptasi. Salah satu sifat unggul ternak itik dibandingkan dengan unggas lainnya adalah daya adaptasi yang tinggi terhadap lingkungan seperti kondisi iklim yang berbeda meskipun lingkungan tempat hidupnya terbilang kotor dan tidak terawat serta tidak membutuhkan kandang yang kompleks (Kadarumba *et al.*, 2022).

Pemberian pakan itik ada yang berasal dari bahan pakan nabati adalah bahan pakan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Bahan pakan nabati ini umumnya mempunyai serat kasar tinggi, misalnya dedak dan daun-daunan yang disukai (dimakan) oleh itik. Disamping itu bahan pakan nabati banyak pula yang mempunyai kandungan protein tinggi seperti bungkil kelapa, bungkil kedelai, dan bahan pakan asal kacang-kacangan. Dan tentu saja kaya akan energi seperti jagung. Pemberian pakan itik yang bahan pakan berasal hewan ini umumnya merupakan limbah industri, sehingga sifatnya memanfaatkan limbah. Bahan pakan hewani yang biasa digunakan adalah tepung ikan, tepung tulang, tepung udang dan tepung kerang. Beberapa bahan pakan hewan yang lain adalah cacing, serangga, ulat dan lain-lain (Deviyanti *et al.*, 2023).

Menurut (Crompton dan Nesheim, 2016) alat pencernaan pada itik adalah sebagai berikut:

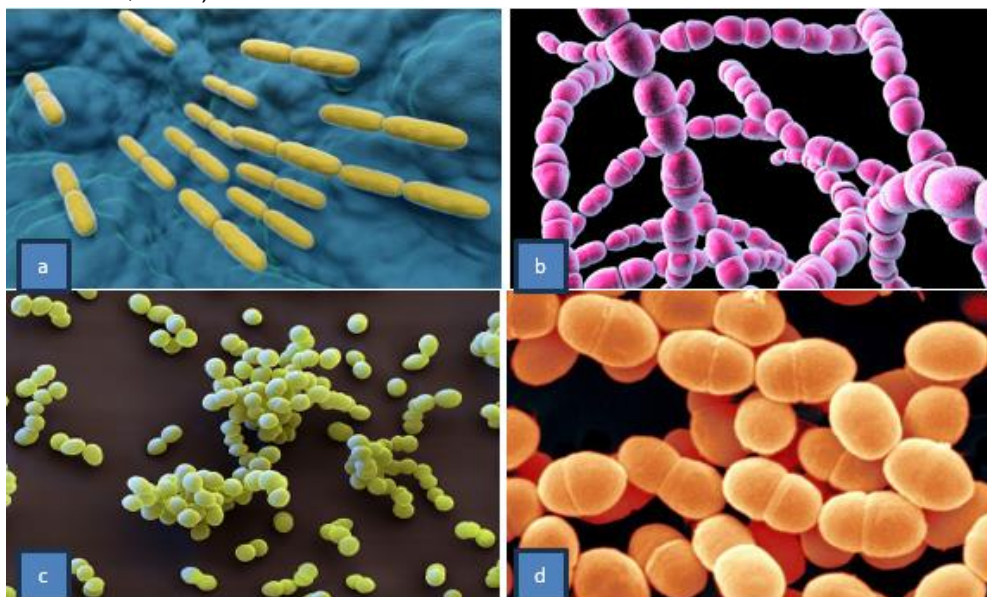
- a. Mulut: yang terdiri atas paruh dan ruang paruh serta lidah. Makanan yang masuk oleh pergerakan lidah didorong masuk ke dalam pharynx, yang kemudian ditelan. Makanan yang terapung-apung di air ditelan dengan bantuan alat penyaringan yang berupa lamella parallel.
- b. Pharynx: proses menelan pada ternak itik tidak bersifat peristaltik karena itik tidak memiliki palat halus dan muskulus konstriktor pada pharynxnya.
- c. Esophagus: makanan masuk ke esophagus semata-mata oleh adanya gravitasi (gaya berat) makanan dan karena tekanan yang lebih rendah di dalam ruang esophagus oleh leher yang dijulurkan ke atas. Demikian juga halnya dengan proses menelan air.
- d. Crop: merupakan pelebaran dinding esophagus. Pada itik dan unggas air pada umumnya crop tidak berkembang dengan sempurna. Tidak seperti pada ayam atau burung-burung pemakan rumput. Crop semata-mata berfungsi sebagai penampung sementara bagi makanan. Di sini makanan dilunakkan dengan bantuan saliva dari mulut serta dari kelenjar esophagus dan crop sendiri.
- e. Perut: terdiri atas perut kelenjar (proventrikulus) dan perut muscular (ventrikulus) sebagai alat penghancur makanan
- f. Usus halus (intestine) terdiri atas duodenum sepanjang antara 22-38 cm, jejunum sepanjang 105 cm dan ileum sepanjang 15 cm
- g. Kolon: terdapat dua ceca yang masing-masing panjangnya antara 10-20 cm
- h. Rectum

i. Kloaka

Saluran pencernaan unggas termasuk itik merupakan tempat hidup bagi mikroflora yang dibentuk setelah dilahirkan. Mikroflora indigenous dewasa akan menjadi carrier (pembawa) koloni mikroorganisme patogen seperti *Salmonella* dan *E. coli*. Sedangkan mikroflora yang menyokong kesehatan unggas terdiri atas berbagai macam spesies mikroorganisme, seperti *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* dan *Bacteroides* yang sebagian besar merupakan mikroorganisme yang predominan. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, dan *Bacteroides* dapat diisolasi dan dipreparasi sebagai probiotik. Penggunaan probiotik dapat mempengaruhi keberhasilan produksi mikroflora kompetitif dalam menyerang bakteri patogen pada unggas (Sutrisna *et al.*, 2013).

1.2.2 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) didefinisikan sebagai bakteri yang menghasilkan asam laktat sebagai produk fermentasi utamanya. Kelompok besar ini termasuk *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, dan *Leuconostoc*. BAL memiliki kemampuan biosintesis yang terbatas sehingga memerlukan pasokan purin, pirimidin, vitamin, dan asam amino. BAL tersebar di saluran pencernaan hewan yaitu usus dan hidup sebagai flora normal hewan (Masood *et al.*, 2011).



Gambar 2. Contoh Bakteri Kelompok BAL (a) *Lactobacillus bulgaricus* (b) *Streptococcus thermophilus* (c) *Enterococcus faecalis* (d) *Lactococcus lactis*
(Sumber: Istock dan Science Source)

No.	Genus	Nature	Species	Sources	Products
1	<i>Lactobacillus</i>	Gram positive	<i>Lactobacillus. acidophilus</i> <i>Lactobacillus. helveticus</i> <i>Lactobacillus. casei</i> <i>Lactobacillus. plantarum</i> <i>Lactobacillus. brevis</i> <i>Lactobacillus. ermentum</i> <i>Lactobacillus. reuteri</i>	Vagina, gastrointestinal tract.	Yogurt, Wine, Beer, Cheese, and Lactic acid
2	<i>Leuconostoc</i>	Gram positive	<i>Leuconostoc. inhae</i> <i>Leuconostoc. kimchii</i> <i>Leuconostoc. lactis</i>	Sour cabbage, sourdough	Dextran, Lactic acid, and Sauerkraut
3	<i>Enterococcus</i>	Gram positive	<i>Enterococcus. faecalis</i> <i>Enterococcus. faecium</i>	Sausage	Enterocin and lactic acid
4	<i>Streptococcus</i>	Gram positive	<i>Streptococcus. bovis</i> <i>Streptococcus. mitis</i> <i>Streptococcus. oralis</i> <i>Streptococcus. suis</i>	Vagina, throat, and bovine bulk milk	Lactate
5	<i>Lactococcus</i>	Gram positive	<i>Lactococcus. lactis</i> <i>Lactococcus. plantarum</i> <i>Lactococcus. piscium</i>	Dairy products	Cheese and Lactic acid

Tabel 1. Sumber dan Produk Bakteri Asam Laktat (Masood *et al.*, 2011)

Fermentasi adalah proses yang dilakukan oleh mikroorganisme yang bertujuan mengawetkan dan mengubah tekstur. Fermentasi asam laktat dapat terjadi sebagai akibat aktivitas bakteri asam laktat (BAL) yang dibedakan menjadi dua kelompok yaitu bakteri asam laktat homofermentatif dan heterofermentatif. Proses fermentasi bersifat homofermentatif jika hanya menghasilkan satu jenis komponen saja, misalnya asam laktat. Contoh spesiesnya adalah *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus thermophilus*, dan *Lactobacillus delbrueckii*. Sedangkan *Lactobacillus* heterofermentatif yang bersifat termofilik yaitu *Lactobacillus fermentum*. *Lactobacillus* homofermentatif yang tumbuh di bawah suhu optimal adalah *L. casei*, *L. plantarum*, dan *L. leichmannii*. Sedangkan fermentasi bersifat heterofermentatif bila menghasilkan campuran berbagai senyawa atau komponen lainnya, misalnya asetat, etanol, karbon dioksida, dan asam laktat seperti *Lactobacillus* heterofermentatif meliputi *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. pastorianus* (Yanti dan Dali, 2013; Frazier 1981). Lavefve *et al.* (2019) menyatakan bahwa bioteknologi fermentasi didefinisikan sebagai proses yang dapat mendorong pertumbuhan mikroba pembentuk asam dan alkohol serta menekan pertumbuhan mikroba proteolitik dan lipolitik beserta aktivitas metabolismenya dalam mengubah bahan makanan mentah. Sedangkan menurut Widyastuti dan Sofarianawati (1999), BAL adalah kelompok bakteri yang mampu memfermentasi gula atau karbohidrat untuk memproduksi asam laktat dalam jumlah besar. Ciri-ciri bakteri asam laktat secara umum bereaksi negatif terhadap katalase dan tidak membentuk spora.

Sifat terpenting dari bakteri asam laktat adalah kemampuannya untuk merombak senyawa kompleks menjadi senyawa yang sederhana sehingga dihasilkan asam laktat. Sifat ini penting dalam pembuatan produk fermentasi termasuk silase. Produk asam menyebabkan pertumbuhan mikroba lain yang tidak diinginkan terhambat (Natalia dan Priadi, 2006). Bakteri patogen seperti *Salmonella* dan *Staphylococcus aureus* yang terdapat pada suatu bahan akan dihambat pertumbuhannya jika dalam bahan terdapat bakteri asam laktat (Rahayu *et al.*, 2004).

Bakteri Asam Laktat dapat bertahan hidup pada medium yang sesuai atau medium yang memiliki komposisi nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhannya.

Agar tetap bertahan hidup, BAL dalam pertumbuhannya memerlukan sumber nitrogen yang berupa asam amino, sumber karbon atau energi berupa karbohidrat, sumber vitamin berupa vitamin B dan sumber mineral berupa Mg, Mn, dan S. Beberapa bahan pakan yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbohidrat dan sumber nitrogen diantaranya adalah dedak padi dan molases (Sutrisna *et al.*, 2017). Bakteri asam laktat memiliki peranan yang penting dalam kehidupan karena kemampuannya untuk menghasilkan makanan fermentasi maupun untuk hidup di dalam saluran pencernaan. Bakteri asam laktat menghasilkan senyawa yang mampu menghambat dan membunuh mikroorganisme pembusuk atau biasa disebut senyawa antimikroba. Senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh BAL perlu diuji untuk mengetahui kemampuannya sebagai probiotik. Adanya senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh BAL dapat dilihat dari kemampuannya menghambat pertumbuhan bakteri uji yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan membentuk zona bening yang terdapat di sekitar sumur agar (Aritonang *et al.*, 2019).

1.2.3 Tinjauan Umum Bakteri Probiotik

Saat ini asupan makanan dan multivitamin yang diberikan pada hewan ternak menjadi faktor utama menjaga kesehatan hewan ternak. Pemberian makanan yang tidak higienis, tidak bergizi dapat menjadi ancaman penyakit bagi hewan ternak terkait. Sebab di dalam makanan yang diberikan bisa mengandung virus yang ditularkan oleh udara atau dari hewan lainnya. Dari fenomena hewan ternak yang terkena penyakit menunjukkan bahwa pemberian multivitamin pada hewan ternak sangat diperlukan untuk menjaga kekebalan tubuh hewan agar tidak mudah terserang penyakit. Dampak akibat penggunaan antibiotik dalam pakan yaitu dapat menyebabkan resistensi bakteri pada manusia dan hewan, terutama jika mengandung antibiotik. Sehingga solusi terbaik untuk mengatasi imunitas hewan ternak dan menghindari dampak negatif dari pemberian antibiotik adalah dengan mengonsumsi mikroorganisme hidup yang menguntungkan usus (probiotik), komponen noncerna (prebiotik), serta kombinasi probiotik dan prebiotik (sinbiotik) (Permadi *et al.*, 2018).

Sejarah istilah probiotik berasal dari bahasa Yunani yang berarti 'untuk hidup'. Istilah ini digunakan pertama kali digunakan pada tahun 1965 oleh Lilley dan Stilwell yang diartikan sebagai substansi yang dihasilkan oleh satu mikroba yang dapat menstimulasi pertumbuhan mikroba lain. Selanjutnya digunakan oleh Parker (1974) untuk menjelaskan organisme atau substansi yang memiliki kontribusi terhadap keseimbangan mikroba intestinal. Definisi probiotik selanjutnya diperbaiki oleh Fuller (1989) yang berarti suplemen makanan berupa mikroba hidup yang memiliki efek menguntungkan bagi inang yang mengkonsumsi melalui keseimbangan mikroba intestinal.

Menurut FAO (*Food and Agriculture Organization*), probiotik adalah suatu mikroorganisme hidup yang bermanfaat bagi kesehatan inang (baik itu hewan maupun manusia). Prinsip kerja probiotik yaitu dengan memanfaatkan kemampuan organisme tersebut dalam menguraikan rantai panjang karbohidrat, protein, dan lemak. Kemampuan ini diperoleh karena adanya enzim-enzim khusus yang dimiliki oleh mikroorganisme untuk memecah ikatan. Pemecahan molekul kompleks menjadi

molekul sederhana mempermudah penyerapan oleh saluran pencernaan manusia. Di sisi lain, mikroorganisme pemecah ini mendapat keuntungan berupa energi yang diperoleh dari hasil perombakan molekul kompleks (Widiyaningsih, 2011).

1.2.4 Peranan Probiotik bagi Ternak

Pemberian makanan yang salah dapat mengakibatkan hewan ternak terserang penyakit karena terjadi aktivitas mikroorganisme dalam saluran pencernaan ternak dapat mengakibatkan banyak hal, diantaranya penurunan imunitas hewan yang mengakibatkan mudah terserang penyakit dan terjadi gangguan fungsi usus, penyakit radang yang mengakibatkan ternak terkena diare. Selain itu, hewan bisa mengalami penurunan berat badan dan stress. Dari fenomena hewan ternak yang terkena penyakit menunjukkan bahwa pemberian multivitamin pada hewan ternak sangat diperlukan untuk menjaga kekebalan tubuh hewan agar tidak mudah terserang penyakit. Dampak akibat penggunaan antibiotik dalam pakan yaitu dapat menyebabkan resistensi bakteri pada manusia dan hewan, terutama jika mengandung antibiotic. Akan tetapi dikarenakan alasan masalah resistensi, mulai 1 Januari 2006 Uni Eropa memutuskan untuk melarang penggunaan antibiotik sebagai pakan imbuhan (SIMON, 2005).

Probiotik berperan untuk menciptakan keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan sehingga menciptakan kondisi yang optimum untuk pencernaan pakan dan meningkatkan efisiensi konversi pakan sehingga memudahkan proses penyerapan zat nutrisi ternak, meningkatkan kesehatan ternak, memperpendek jarak beranak, mempercepat pertumbuhan, menurunkan kematian, dan memproteksi dari penyakit patogen tertentu sehingga dapat meningkatkan produksi susu atau daging, lebih tahan terhadap stress, penyakit, dan memiliki sintasan yang tinggi serta *Feed Conversion Ratio* (FCR) yang merupakan perbandingan antara jumlah pakan yang digunakan dengan jumlah bobot ternak yang dihasilkan lebih rendah. Selain itu, probiotik adalah salah satu pakan imbuhan atau biasa disebut sebagai *feed additive* berupa mikroba hidup menguntungkan yang mempengaruhi induk semang melalui perbaikan keseimbangan mikroorganisme dalam saluran pencernaan. Spesies *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* yang paling sering digunakan sebagai probiotik, namun spesies ragi *Saccharomyces cerevisiae* dan beberapa *Escherichia coli* dan *Bacillus* juga digunakan sebagai probiotik (Permadi *et al.*, 2018).

Probiotik dalam saluran pencernaan mampu meningkatkan performa pertumbuhan ternak, yaitu konsumsi ransum, konversi ransum serta penambahan bobot badan yang optimal karena meningkatnya daya cerna dan daya serap nutrisi dengan cara menekan bakteri patogen dalam saluran pencernaan sehingga mendukung perkembangan bakteri baik yang membantu penyerapan zat nutrisi (Kompang, 2002). Mekanisme kerja probiotik dalam pakan adalah bakteri probiotik berkompetisi dengan bakteri patogen sehingga jumlah populasi bakteri asam laktat lebih banyak dibandingkan dengan bakteri patogen dalam saluran pencernaan (Putri *et al.*, 2019). Sedangkan menurut Sumarsih *et al.* (2012). Pemberian probiotik memberikan efek menguntungkan seperti pengurangan kemampuan mikroorganisme patogen dalam memproduksi toksin, menstimuli enzim pencernaan serta dihasilkannya vitamin dan substansi antimikrobial sehingga meningkatkan

status kesehatan inang. Keuntungan lain penggunaan probiotik adalah dapat mengurangi tekanan negatif yang diakibatkan adanya hambatan pakan (berupa anti nutrisi) pada pakan karena probiotik mampu menstimulasi peningkatan ketersediaan zat gizi bagi induk semang.

Mikroorganisme probiotika mampu mengatur beberapa aspek dari sistem kekebalan hewan inang. Kemampuan mikroba probiotika mengeluarkan toksin yang mereduksi/menghambat perkembangan mikroba-mikroba patogen dalam saluran pencernaan merupakan suatu kondisi yang dapat meningkatkan kekebalan hewan inang. Toksin yang dihasilkan tersebut merupakan antibiotika bagi mikroba patogen sehingga penyakit yang ditimbulkan oleh mikroba patogen tersebut akan berkurang dan dapat hilang atau sembuh dengan sendirinya. Hal ini akan memberikan keuntungan terhadap kesehatan hewan inang sehingga tahan terhadap serangan penyakit. Penggunaan probiotika pada ternak unggas dilaporkan dapat menurunkan aktivitas urease yaitu suatu enzim yang bekerja menghidrolisis urea menjadi amonia sehingga pembentukan amonia menjadi berkurang. Amonia adalah suatu bahan yang dapat menyebabkan keracunan pada ternak unggas (Yeo dan Kim, 1997).

1.2.5 Karakteristik Probiotik

Tidak semua bakteri yang termasuk BAL dapat dijadikan sebagai bakteri probiotik. Syarat utama mikroba yang dapat difungsikan sebagai mikroba probiotik antara lain tahan terhadap pH rendah, mampu tumbuh pada garam empedu, mampu berkoloni, memiliki aktivitas antimikroba (Sunaryanto *et al.*, 2014). Sedangkan menurut Widiyaningsih (2011) probiotik yang efektif harus memenuhi kriteria yaitu memberikan efek yang menguntungkan bagi host yaitu mengandung sejumlah sel besar hidup yang mampu bertahan dan melakukan metabolisme dalam usus halus manusia yang memberikan efek positif bagi kehidupan mikroflora di usus halus, probiotik juga harus mampu menempel pada sel epitel usus manusia, mampu membentuk kolonisasi pada saluran pencernaan, mampu menghasilkan zat anti mikroba (bakteriosin), dan memberikan pengaruh yang menguntungkan bagi kesehatan manusia. Syarat lainnya adalah tidak bersifat patogen dan aman jika dikonsumsi. Strain probiotik juga harus tahan dan tetap hidup selama proses pengolahan makanan dan penyimpanan, mudah diaplikasikan pada produk makanan, tahan terhadap proses psikokimia pada makanan, mempunyai sensori yang baik dan tidak meningkatkan angka keasaman selama penyimpanan.

Probiotik yang efektif adalah bakteri yang mempunyai karakteristik berupa bakteri yang dapat dipreparasi sebagai "*viable product*" dan dibuat dalam skala industri, harus tetap stabil dan *viable* dalam jangka panjang baik dalam penyimpanan maupun di lapangan, harus bertahan dalam saluran pencernaan khususnya dalam usus halus dan tidak diharuskan tumbuh dalam usus halus, dan harus bermanfaat bagi inang atau induk semang (Surono, 2004). Adapun karakterisasi bakteri asam laktat menurut Aritonang *et al.* (2019) yang dapat digolongkan ke dalam bakteri probiotik adalah:

1. Isolat bakteri yang diperoleh memiliki karakteristik yang dimiliki oleh Bakteri Asam Laktat berdasarkan pewarnaan gram, pengamatan bentuk sel, uji katalase, pengujian produksi gas dari glukosa, uji ketahanan terhadap asam

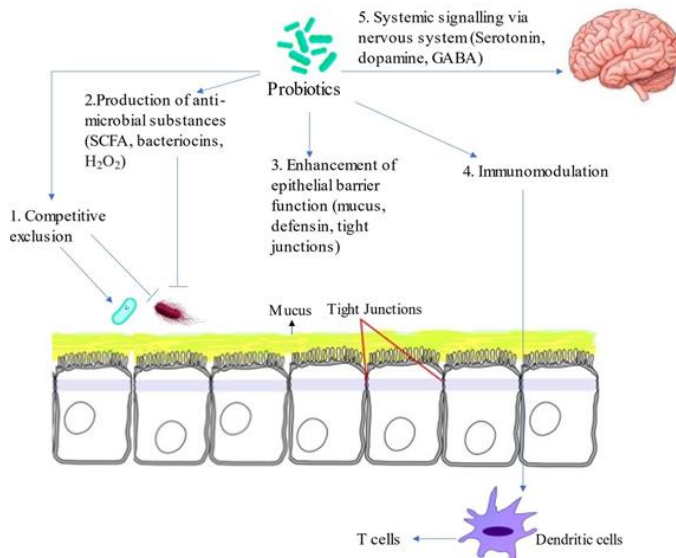
klorida, uji ketahanan terhadap garam empedu (oxgall), dan uji aktivitas antimikroba bal pada berbagai bakteri uji yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

2. Sebagai materi hidup yang tidak berbahaya
3. Dapat bertahan hidup selama dilakukan proses dan penyimpanan
4. Memiliki efek antagonis terhadap bakteri patogen

Menurut Febrianti *et al.* (2016) BAL yang digolongkan sebagai probiotik harus toleran bertahan dalam kondisi pH lambung yang rendah, tahan terhadap keasaman garam empedu, dan enzim-enzim pencernaan yang akan dilewati oleh bakteri probiotik selama perjalanannya menuju kolon. Umumnya, bakteri tumbuh optimal pada kondisi pH netral yakni 7,0. Namun biasanya spesies BAL lebih toleran terhadap kondisi lingkungan pH asam. Hal ini berkaitan dengan kondisi saluran pencernaan hewan yang tergolong memiliki kondisi dengan pH rendah atau asam.

1.2.6 Mekanisme Kerja Probiotik

Probiotik dapat berupa bakteri, jamur dan ragi. Akan tetapi yang paling bersifat probiotik adalah bakteri. Mekanisme kerja probiotik terdiri dari (1) Probiotik yang menjalankan fungsinya melalui kompetisi dengan bakteri patogen untuk mendapatkan nutrisi dan reseptor untuk mengikat bakteri patogen sehingga menghambat kelangsungan hidup dan penempelannya pada mukosa usus. (2) Probiotik menghasilkan zat antimikroba yang menghambat pertumbuhan patogen. (3) Probiotik meningkatkan fungsi penghalang epitel dengan meningkatkan produksi lendir dan meningkatkan ekspresi protein sambungan ketat yang mencegah translokasi patogen dari usus ke dalam darah. (4) Probiotik mengatur imunitas inang dengan memodulasi maturasi dan fungsi sel dendritik sehingga meningkatkan aktivitas sel T yang berperan penting dalam homeostasis imun. (5) Probiotik mengatur produksi neurotransmitter termasuk serotonin, dopamin dan asam gamma aminobutyric (GABA) (Latif *et al.*, 2023).



Gambar 3. Mekanisme Kerja Probiotik (Latif *et al.*, 2023)

Sedangkan menurut Aritonang *et al.* (2019) mekanisme kerja probiotik dalam melindungi atau memperbaiki kondisi inangnya antara lain dengan menghambat pertumbuhan bakteri patogen melalui beberapa cara diantaranya:

1. Memproduksi substansi-substansi penghambat. Probiotik mampu memproduksi zat-zat penghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun negatif. Zat-zat ini termasuk asam organik, hidrogen peroksida (H₂O₂), bakteriosin, reuterin yang tidak hanya mampu menghambat bakteri hidup namun juga produksi toksin.
2. Menghambat perlekatan bakteri patogen dengan berkompetisi di tempat perlekatan permukaan mukosa saluran cerna. Cara ini diduga juga merupakan salah satu cara probiotik dalam menghambat invasi dari bakteri pathogen.
3. Kompetisi nutrisi. Bakteri-bakteri yang menguntungkan (probiotik) akan berkompetisi dengan bakteri patogen dalam hal memperebutkan nutrisi dalam saluran cerna.
4. Menurunkan pH lingkungan. Bakteri asam laktat akan mengubah glukosa menjadi asam laktat sehingga pH lingkungan menjadi rendah. Dalam kondisi seperti ini pada pH rendah dan suasana asam maka akan menghambat pertumbuhan jenis bakteri patogen. Dengan demikian probiotik dapat mengurangi jumlah bakteri patogen di saluran pencernaan sehingga penggunaan probiotik lebih efisiensi dan lebih baik.

1.2.7 Jenis-Jenis Probiotik

Menurut Pintado *et al.* (2014) walaupun banyak mikroorganisme yang menguntungkan dan memberikan kesehatan bagi inang dan dapat digolongkan sebagai probiotik, tetapi yang bisa dinyatakan betul-betul sebagai probiotik hanya beberapa genus saja sehubungan dengan karakteristik yang dimilikinya sesuai dengan sifat dari probiotik. Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan salah satu kelompok bakteri yang banyak digunakan sebagai bakteri probiotik, akan tetapi tidak semua BAL termasuk sebagai bakteri probiotik (Permadi *et al.*, 2018). Genus bakteri dan fungi yang memiliki karakteristik seperti halnya probiotik diantaranya hampir sebagian besar dari spesies *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* dan spesies dari ragi yaitu *Saccharomyces*. Genus bakteri lainnya seperti *Streptococcus*, *Enterococcus* dan *Bacillus* sudah banyak diteliti. Adapun genus *Enterococcus* dan *Bacillus* masih perlu perhatian khusus dalam hal keamanan yang dimilikinya. Beberapa dari genus tersebut sudah banyak digunakan sebagai kultur tunggal (*single culture*) atau dicampur dalam satu formula.

Tabel 2. Mikroorganisme yang Digunakan sebagai Probiotik (Kerry *et al.*, 2018)

Sl. No.	Probiotic bacterial genera	Species involved
1	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. bulgaricus</i>
2	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. jensenii</i> , <i>P. freudenreichii</i>
3	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. productus</i>
4	<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. laterosporus</i>
5	<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i>
6	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
7	<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
8	<i>Streptococcus</i>	<i>S. sanguis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. salivarius</i>
9	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i>
10	<i>Bacteroides</i>	<i>B. uniformis</i>
11	<i>Akkermansia</i>	<i>A. muciniphila</i>
B	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i>

Pada makanan dan pakan, *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* adalah probiotik yang paling umum digunakan. Mikroorganisme lain seperti ragi *Saccharomyces cerevisiae* dan beberapa *Escherichia coli* dan spesies *Bacillus* juga digunakan sebagai probiotik. Keberadaan komunitas bakteri ini membantu proses pencernaan makanan termasuk sayuran dan buah-buahan. *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* merupakan jenis bakteri yang dominan tidak saja di kolon tetapi juga di dalam usus halus. Selain banyak ditemukan di sistem pencernaan, bakteri probiotik juga dapat ditemukan pada beberapa bahan komersial yaitu makanan fermentasi seperti yogurt dan kimchi serta suplemen probiotik (Bodke *et al.*, 2022).

Tabel 3. Strain Probiotik dan Produk Komersialnya (Bodke *et al.*, 2022).

Strain	Commercial products	Source
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Sold as ingredient	Danisco (Madison, WI)
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HN001 (DR20)		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> boulardii	Florastor	Biocodex (Creswell, OR)
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35,264	Align	Procter and Gamble (Mason, OH)
<i>Lactobacillus fermentum</i> VRI003 (PCC)	Sold as ingredient	Probiomics (Eveleigh, Australia)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011	Sold as ingredient	Institut Rosell (Montreal, Canada)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> R0052		
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA5	Sold as ingredient	Chr. Hansen (Milwaukee, WI)
<i>Lactobacillus paracasei</i> CRL 431		
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Sold as ingredient	Chr. Hansen (Milwaukee, WI)
<i>Lactobacillus casei</i> strain Shirota	Yakult	Yakult (Tokyo, Japan)
<i>Bifidobacterium breve</i> strain Yakult		
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001 ("L. casei Immunitas")	DanActive fermented milk	Danone (Paris, France)
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN173 010 ("Bifidus regularis")	Activia yogurt	Dannon (Tarrytown, NY)
<i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14	FemDophilus	Chr. Hansens (Milwaukee, WI)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1		Urex Biotech (London, Ontario, Canada)
<i>Lactobacillus johnsonii</i> Lj-1	LC1	Jarrow Formulas (Los Angeles, CA)
(same as NCC533 and formerly)		Nestlé (Lausanne, Switzerland)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-1)		
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299 V	Sold as ingredient; Good Belly juice product	Probi AB (Lund, Sweden); NextFoods (Boulder, Colorado)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 271	Sold as ingredient	Probi AB (Lund, Sweden)
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55,730 ("L. reuteri Protectis")	BioGaia Probiotic chewable tablets or drops	Biogaia (Stockholm, Sweden)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ("LGG")	Culturelle; Dannon Danimals	Valio Dairy (Helsinki, Finland) The Dannon Company (Tarrytown, NY)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	Sold as ingredient	Essum AB (Umeå, Sweden)
<i>Lactococcus lactis</i> L1A		
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	e	University College Cork (Cork, Ireland)
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536	Sold as ingredient	Morinaga Milk Industry Co. Ltd. (Zama-City, Japan)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LB	Sold as ingredient	Lacteol Laboratory (Houdan, France)
<i>Lactobacillus paracasei</i> F19	Sold as ingredient	Medipharm (Des Moines, Iowa)
<i>Lactobacillus paracasei</i> 33	Sold as ingredient	GenMont Biotech (Taiwan)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GM-020		
<i>Lactobacillus paracasei</i> GMNL-33		
<i>Lactobacillus plantarum</i> OM	Sold as ingredient	Bio-Energy Systems, Inc. (KalisPELL, MT)
<i>Bacillus coagulans</i> BC30	Sustenex, Digestive Advantage and sold as ingredient	Ganeden Biotech Inc. (Cleveland, Ohio)
<i>Streptococcus oralis</i> KJ3	ProBiora3	Oragenics Inc. (Alachua, FL)
<i>Streptococcus uberis</i> KJ2	EvoraPlus	
<i>Streptococcus rattus</i> JH145		
<i>Lactobacilli rhamnosus</i> PBO1	EcoVag	Bifodan (Denmark)
<i>Lactobacilli gasseri</i> EB01		

Tabel 4. Contoh Probiotik dan Sumbernya pada Pencernaan Hewan

No.	Probiotik	Sumber Pencernaan Hewan	Referensi
1.	<i>Bacillus subtilis</i>	Usus ayam	Husain <i>et al.</i> (2020)
2.	<i>Enterococcus faecalis</i>	Usus itik	Nurhikmayani <i>et al.</i> (2015)
3.	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	Usus itik	Nurhikmayani <i>et al.</i> (2015)
4.	<i>Enterococcus faecium</i>	Usus sapi	Liu <i>et al.</i> (2023)
5.	<i>Bifidobacterium animalis</i>	Usus tikus	Zhang <i>et al.</i> (2020)
6.	<i>Akkermansia muciniphila</i>	Usus babi	McCormark <i>et al.</i> (2017)

1.3 Tujuan

1. Memperoleh isolat bakteri probiotik asal usus itik jantan *Anas domestica* di Dusun Tambua Desa Bonto Marannu Kecamatan Lau Kabupaten Maros.
2. Mengetahui karakteristik bakteri probiotik asal usus itik jantan *Anas domestica* di Dusun Tambua Desa Bonto Marannu Kecamatan Lau Kabupaten Maros

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah dan referensi untuk penelitian-penelitian selanjutnya terkait karakteristik bakteri yang berpotensi sebagai probiotik dari usus itik jantan *Anas domestica* di Dusun Tambua Desa Bonto Marannu Kecamatan Lau Kabupaten Maros.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar, pada bulan Februari 2024 – Mei 2024.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat glass, yaitu berupa erlenmeyer, gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, cawan petri, batang pengaduk, kaca preparat (*object glass*), dan kaca preparat (*deck glass*). Adapun alat-alat non-glass yang digunakan, yaitu pipet tetes, mikropipet, spoit, jarum ose, sendok tanduk, rak tabung reaksi, penjepit tabung reaksi, labu semprot, bunsen, pinset, pencadang, scalpel, dan jangka sorong. Selain itu, juga digunakan alat-alat instrumen berupa *Laminar Air Flow* (LAF), oven, inkubator, autoklaf, timbangan digital, hot plate, vortex, shaker, mikroskop, dan spektrofotometer.

2.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah usus segar itik Jantan *Anas domesticus*, air suling, alkohol 70%, media selektif MRSA (*de Man Rogosa Sharpe Agar*) (OXOID), media selektif MRSB (*de Man Rogosa Sharpe Broth*) (OXOID), media NA (*Nutrient Agar*) (MERCK), media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) (MERCK), media SIM (*Sulfid Indol Motility*) (MERCK), media MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*) (MERCK), KOH 40%, alfanol, *methyl-red*, reagen H₂O₂, pewarnaan gram (kristal violet, lugol, alkohol-aseton, dan safranin), NaCl fisiologis, HCl 0.1 N, garam empedu sintetik (*ox bile*) 1% dan 5%, CaCO₃ 1%, aluminium foil, kapas, minyak emersi, *cling wrap*.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Sterilisasi Alat

- a. Sterilisasi dengan metode panas kering dengan suhu 130°C – 180°C selama 30 menit. Metode sterilisasi ini digunakan misalnya pada alat-alat gelas, seperti tabung reaksi, beaker glass dan cawan petri. Sterilisasi panas kering memiliki prinsip dasar yaitu melalui mekanisme konduksi, panas akan diabsorpsi oleh permukaan luar dari peralatan yang akan disterilkan, lalu merambat ke bagian lebih dalam dari peralatan. Instrumen yang digunakan pada proses sterilisasi ini yaitu oven (Mansur *et al.*, 2019).
- b. Sterilisasi panas membara yaitu dengan cara jarum ose disterilkan di atas nyala api Bunsen hingga merah membara (Mansur *et al.*, 2019).
- c. Sterilisasi panas basah yaitu dengan menggunakan alat non-instrumen berupa autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Alat yang menggunakan proses sterilisasi ini yaitu media pertumbuhan bakteri dan alat nonglass (Mansur *et al.*, 2019).

2.3.2 Pembuatan Media

a. Pembuatan Medium MRSA (*Mann Rogosa Sharpe Agar*)

Sebanyak 6,2 g media MRSA dan CaCO_3 1% dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dan dibuat dalam pH 6,2. Selanjutnya larutan dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Setelah itu, larutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan menggunakan alumunium foil pada bagian mulut erlenmeyer. Dilakukan sterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

b. Pembuatan Medium MRSB (*Man Ragosa Sharpe Broth*)

Sebanyak 5,2 g media MRSB dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dan dibuat dalam pH 6,2. Selanjutnya larutan dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Setelah itu, larutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan menggunakan alumunium foil pada bagian mulut erlenmeyer. Dilakukan sterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

c. Pembuatan Medium NA (*Nutrien Agar*)

Sebanyak 2 g media NA dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dan dibuat dalam pH 7. Selanjutnya larutan dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Setelah itu, larutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan menggunakan alumunium foil pada bagian mulut erlenmeyer. Dilakukan sterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

d. Pembuatan Medium TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Sebanyak 6,5 g media TSIA dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dan dibuat dalam pH 7,4. Selanjutnya larutan dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Setelah itu, media dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi yang masing-masing sebanyak 7 mL. Kemudian, dilakukan sterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

e. Medium SIM (*Sulfid Indol Motility*)

Sebanyak 3 g media SIM dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dan dibuat dalam pH 7,3. Selanjutnya larutan dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Setelah itu, media dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi yang masing-masing sebanyak 7 mL. Kemudian, dilakukan sterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

f. Medium MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*)

Sebanyak 1,7 g media MR-VP dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dan dibuat dalam pH 6,9. Selanjutnya larutan dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Setelah itu, media dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi yang masing-masing sebanyak 5 mL. Kemudian, dilakukan sterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.3 Pengambilan Sampel Itik Jantan *Anas domesticus*

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah itik jantan *Anas domesticus* sehat dan tidak dalam keadaan stress diambil dari daerah persawahan Dusun

Tambua Desa Bonto Marannu Kecamatan Lau Kabupaten Maros. Sampel kemudian disembelih dan disayat bagian ventral daerah abdomen, sehingga bagian otot dada dapat dilepas. Selanjutnya, diambil dengan hati-hati saluran pencernaan dari perut itik secara aseptis dengan tujuan agar didapatkan bagian usus yang masih utuh dan panjang. Semua kontaminan yang terdapat di dalam usus itik yang telah diambil kemudian dibuang, lalu usus tersebut dicuci dengan akuades steril untuk menghasilkan kondisi yang steril sebelum dimasukkan dalam bag steril. Sampel usus itik jantan *Anas domesticus* kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin untuk dilakukan proses selanjutnya yaitu isolasi dan karakterisasi bakteri probiotik pada sampel tersebut.

2.3.4 Isolasi Bakteri Probiotik

Sampel usus itik jantan *Anas domesticus* kemudian ditimbang dan dilakukan penambahan larutan NaCl fisiologis steril (1:9). Dimasukkan ke dalam stomacher untuk mengeluarkan isi usus tersebut. Setelah itu memasukkan suspensi tersebut ke dalam larutan NaCl fisiologis steril untuk selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7}).

Selanjutnya, diinokulasikan pada media MRSA yang ditambahkan CaCO_3 1% untuk setiap 1 mL dari semua tingkat pengenceran ke dalam cawan petri dengan menggunakan metode tuang (*pour plate*). Dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 2×24 jam. Pertumbuhan bakteri asam laktat ditandai dengan zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri.

2.3.5 Pemurnian Bakteri Asam Laktat

Pemurnian dimulai dengan memilih koloni-koloni yang di sekitarnya terbentuk zona bening. Koloni bakteri tersebut kemudian diinokulasikan pada media MRSA yang mengandung CaCO_3 1% dengan metode quadrant streak untuk mendapatkan koloni murni. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2×24 jam. Tahap pemurnian ini dapat dilakukan beberapa kali hingga diperoleh koloni bakteri yang benar-benar murni.

2.3.6. Pembuatan Stok Isolat Bakteri Asam Laktat

Setelah tahap pemurnian, setiap koloni murni yang tumbuh pada media MRSA yang mengandung CaCO_3 1% kemudian dilakukan inokulasi pada media MRSA miring sebagai stok isolat untuk uji-uji selanjutnya.

2.3.7 Pengamatan Morfologi Bakteri Probiotik

a. Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri

Diamati morfologi untuk koloni murni yang terbentuk setelah dilakukan proses pemurnian. Dilakukan pengamatan morfologi koloni bakteri yang mencakup bentuk (*shape*), bentuk tepi (*margin*), warna (*color*) dan bentuk permukaan koloni bakteri (*elevation*).

b. Pengamatan Morfologi Sel Bakteri

Pengamatan untuk morfologi sel bakteri dilakukan dengan menggunakan teknik pewarnaan gram. Pertama-tama ulasan bakteri dibuat pada permukaan kaca preparat dan selanjutnya dilakukan proses fiksasi. Kemudian, sebanyak 2-3 tetes Gram A (kristal violet) ditetaskan pada ulasan bakteri yang berada pada permukaan

kaca preparat dan didiamkan selama 60 detik. Kaca preparat kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu, sebanyak 2-3 tetes Gram B (larutan lugol/JKJ) diteteskan pada ulasan bakteri, didiamkan terlebih dahulu selama 60 detik yang kemudian kaca preparat dicuci dengan menggunakan air mengalir dan dikeringkan.

Ulasan bakteri pada permukaan kaca preparat selanjutnya ditambahkan 2-3 tetes larutan alkohol-aseton dan didiamkan selama 60 detik. Preparat dicuci Kembali menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Lalu ditambahkan lagi 2-3 tetes larutan safranin pada preparat, didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Diamati di bawah mikroskop yang terlebih dulu telah ditambahkan 2-3 tetes minyak imersi. Hasil pewarnaan bakteri Gram positif ditandai koloni berwarna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif koloni bakteri berwarna merah.

2.3.8 Uji BAL Kandidat Bakteri Probiotik

a. Uji Ketahanan Terhadap Keasaman Lambung (pH)

Uji ketahanan terhadap asam lambung (pH) dilakukan dengan menggunakan media MRSB yang dengan penambahan HCl 0,1 N untuk mendapatkan pH 2,5-3 (sesuai dengan pH lambung). Sebanyak 1 ose pada masing-masing isolat dari stok kultur diinokulasikan pada media MRSB + HCl 0,1 N. Kemudian dilakukan proses inkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam (Husain *et al.*, 2017). Hasil positif pertumbuhan bakteri ditandai dengan endapan yang terbentuk pada tabung reaksi dan warna media yang menjadi keruh pada media MRSB yang telah ditambahkan HCl 0,1 N.

b. Uji Ketahanan Terhadap Garam Empedu

Media MRSB ditambahkan dengan garam sintetik (*ox bile*) dengan konsentrasi 1% dan 5%. kemudian sebanyak 1 ose bakteri isolat yang diambil dari stok kultur diinokulasikan pada media MRSB + garam empedu 1% dan 5%. Dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 2x24 jam (Husain *et al.*, 2017). Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan pada tabung reaksi dan warna media yang berubah menjadi keruh yang dapat diamati pada media MRSB + garam empedu 1% dan 5%.

c. Uji Ketahanan Temperatur Suhu

Masing-masing isolat bakteri dari stok kultur diambil sebanyak 1 ose dan dilakukan inokulasi pada media MRSB dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi pada suhu 15°C, 37°C, dan 45°C selama 2x24 jam. Hasil positif apabila terjadi pertumbuhan bakteri pada media dan hasil negatif apabila tidak terjadi pertumbuhan bakteri pada media. Adanya pertumbuhan ditandai dengan media yang menjadi keruh.

2.3.9 Uji Karakterisasi Biokimia

a. Uji MR (*Methyl-Red*)

Diinokulasikan pada media MR-VP isolat yang diambil dari stok kultur sebanyak 1 ose, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 5x24 jam. setelah itu, media kemudian ditambahkan 5 tetes methyl red pada media. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya kompleks warna merah muda sampai merah yang dapat teramati pada media yang menjadi penanda bahwa mikroba tersebut dapat menghasilkan senyawa berupa asam campuran.

b. Uji VP (*Voges Proskauer*)

Diinokulasikan pada media MR-VP isolat yang diambil dari stok kultur sebanyak 1 ose, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 3x24 jam. Setelah itu, media kemudian ditambahkan 0,2 mL KOH 40% dan 0,6 mL alfa naftol dan dihomogenkan selama 30 detik. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya kompleks warna lembayung pada media.

c. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Diinokulasikan sebanyak 1 ose isolat bakteri yang diambil dari stok kultur pada media TSIA dengan metode tusuk pada bagian butt dan metode gores pada bagian slant. Kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam. Adapun perubahan yang dapat teramati setelah dilakukan inkubasi yaitu warna media yang menjadi kuning menandakan asam, sedangkan warna merah pada media yang menandakan media menjadi suasana lebih basa dan warna yang menjadi hitam menandakan terbentuknya H₂S, selain itu yang menandakan jika positif memproduksi gas dapat teramati ketika media terangkat.

d. Uji Motilitas

Diinokulasikan sebanyak 1 ose setiap isolat bakteri yang diambil dari stok kultur ke dalam media SIM (*Sulfide Indole Motility*) dengan metode ditusuk tegak. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya pola pertumbuhan yang menyebar pada area sekitar tusukan ketika proses inokulasi yang menyerupai akar pohon. Hal tersebut menandakan bahwa mikroba pada isolat bakteri melakukan pergerakan (motil). Adapun untuk hasil negatif ditandai tidak adanya pola pertumbuhan yang dapat teramati setelah proses inkubasi pada area sekitar bekas tusukan pada media, sehingga hal tersebut menandakan bahwa mikroba tidak melakukan pergerakan (non motil).

e. Uji Katalase

Diinokulasikan sebanyak 1 ose setiap isolat bakteri yang diambil dari stok kultur pada kaca preparat, lalu ditetesi dengan reagen H₂O₂ (hidrogen peroksida). Hasil positif pada uji katalase ditandai dengan adanya gelembung gas yang terbentuk, sedangkan hasil negatif ketika tidak terbentuk gelembung gas.

2.3.10 Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri Patogen**a. Penyiapan Bakteri Uji**

Digunakan bakteri uji yaitu *S. aureus* sebagai golongan bakteri gram positif dan *Escherichia coli* sebagai bakteri gram negatif. Bakteri uji tersebut diremajakan terlebih dahulu pada media NA miring menggunakan teknik gores yang selanjutnya diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37 °C. Setelah itu, dibuat suspensi bakteri uji dengan mengambil isolat bakteri uji yang telah diremajakan untuk diinokulasikan pada lautan NaCl fisiologis steril dan dihomogenkan menggunakan vortex.

b. Penyiapan Kultur Bakteri Probiotik

Isolasi bakteri probiotik dari stok kultur diinokulasikan pada media MRSB 50 mL dan dishaker pada kecepatan 120 rpm selama 1x24 jam

c. Uji Antibakteri

Pengujian ini menggunakan kultur bakteri probiotik yang di shaker selama 1x24 jam. Kultur bakteri dilakukan sentrifugasi, hingga diperoleh supernatan dan pelet.

Sebanyak 1 mL isolat *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan kekeruhan 25% T diinokulasi pada media NA dengan metode tuang (*pour plate*) dan ditunggu hingga memadat. Sementara itu blank disk steril direndam kedalam masing-masing supernatan bakteri probiotik isolat dari usus itik Jantan *Anas domesticus* dan ciprofloxacin sebagai kontrol positif selama 10 menit. Kemudian setelah memadat, diletakkan blank disk di permukaan medium, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan 48 jam. Diukur diameter hambatan yang terbentuk (mm) dengan menggunakan penggaris.

2.4 Analisis Data

Data yang diperoleh telah diperoleh kemudian diolah secara deskriptif dan hasil analisis data disajikan dalam bentuk gambar maupun tabel. Analisis deskriptif antara lain dengan melihat hasil dari isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat yang potensial sebagai bakteri probiotik. Adapun analisis data tersebut diambil dari diameter uji daya hambat terhadap bakteri patogen *E. coli* atau *S. aureus*.