

**IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI PROBIOTIK DARI AYAM BURAS**  
*Gallus domesticus* ASAL PESISIR KABUPATEN PANGKEP  
MENGUNAKAN METODE GEN 16SrRNA

**SKRIPSI**



**NI PUTU SHINTIA RESKI**

**H041181004**

**DEPARTEMEN BIOLOGI**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS HASANUDDIN**  
**MAKASSAR**  
**2023**

**IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI PROBIOTIK DARI AYAM BURAS *Gallus domesticus* ASAL PESISIR KABUPATEN PANGKEP MENGGUNAKAN METODE GEN 16SrRNA**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada program studi strata satu (S1) pada Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin*

**NI PUTU SHINTIA RESKI**

**H041181004**

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

**2023**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI PROBIOTIK DARI AYAM BURAS  
*Gallus domesticus* ASAL PESISIR KABUPATEN PANGKEP  
MENGUNAKAN METODE GEN 16SrRNA**

**Disusun dan diajukan oleh**

**NI PUTU SHINTIA RESKI**

**H041181004**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Skripsi yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin pada tanggal, 17 Maret 2023 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

**Menyetujui,**

**Pembimbing Utama**



**Prof. Dr. Hj. Dirayah Rauf Husain, DEA.**  
NIP. 196005251986012001

**Pembimbing Pertama**



**Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si**  
NIP. 196512091990082001

**Ketua Program Studi**



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

## PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ni Putu Shintia Reski

NIM : H041181004

Program Studi : Biologi

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa skripsi dengan judul Identifikasi Isolat Bakteri Probiotik dari Ayam Buras *Gallus domesticus* asal Pesisir Kabupaten Pangkep Menggunakan Metode Gen 16SrRNA, adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 17 Maret 2023

Yang Menyatakan

A handwritten signature in black ink is written over a yellow 10,000 Rupiah stamp. The stamp features the number '10000' in large red digits, the text 'REPUBLIK INDONESIA' at the top, and 'METERAI KEUANGAN' at the bottom. A serial number '5BB3DA16X35110Z124' is visible at the bottom of the stamp.

Ni Putu Shintia Reski

## KATA PENGANTAR

*Om Swastiastu.*

*Assalamu 'alaikum Wr. Wb.*

*Salam Sejahtera untuk kita semua.*

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena hanya atas berkat dan karunia-Nya yang diberikan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penelitian ini dan menyusun skripsi dengan judul “Identifikasi Isolat Bakteri Probiotik dari Ayam Buras *Gallus domesticus* asal Pesisir Kabupaten Pangkep Menggunakan Metode Gen 16SrRNA” sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan program pendidikan Sarjana (S1) di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Ada begitu banyak hal yang perlu penulis lalui sedari masa perkuliahan, penelitian hingga selesainya penyusunan skripsi ini yang tentunya tanpa bantuan, arahan, bimbingan, dan motivasi dari berbagai pihak penulis tidak dapat menyelesaikannya dengan sebaik-baiknya. Terimakasih yang tak terhingga kepada orang tua, Bapak I Made Dina dan Ibu Ni Wayan Suparti Asih atas cinta-kasih, kepercayaan dan dukungannya dalam membesarkan penulis terkhusus bimbingannya dalam bidang Pendidikan, semoga penulis kelak bisa mewujudkan pemberian tersebut dengan kesuksesan. Terima kasih juga kepada saudara penulis I Made Krisna Dwi G. serta keluarga besar Cempaka yang selalu mendukung, memberikan masukan dan menyemangati penulis, doa terbaik untuk kalian semua.

Terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada Prof. Dr. Hj. Dirayah R. Husain, DEA selaku pembimbing utama sekaligus Pembimbing akademik atas

inspirasi, bimbingan, arahan, waktu, dan kesabaran yang telah diberikan kepada penulis sejak penulis memulai studi sampai penyusunan skripsi ini, terima kasih atas segala nasehat dan motivasinya sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan S-1 Biologi dengan baik dan lancar. Terima kasih kepada pembimbing pertama Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si atas segala bantuan yang ibu berikan, baik berupa kritik, saran, waktu, pikiran, maupun motivasi yang membantu penulis selama proses penulisan skripsi ini sampai selesai.

Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc., selaku Rektor Universitas Hasanuddin beserta jajarannya.
2. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Si., 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 Dr. Ir. Slamet Santosa, M.Si. dan Ibu Dr. Rosana Agus, M.Si. selaku dosen penguji, terima kasih atas segala arahan dan saran serta motivasi tiada henti yang diberikan kepada penulis demi kesempurnaan skripsi ini.
5. Bapak/Ibu Dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya kepada penulis, baik pada waktu mengikuti perkuliahan maupun pada saat penelitian dan penyelesaian skripsi ini.

6. Fuad Gani, S.Si, dan Heriadi, S.Si, M.Si, Riuh Wardhani, S.Si, M.Si, Masykur, S.Si, Donny Suherman, S.Si, dan Syafrian S.Si, terima kasih atas bimbingan, saran dan ilmunya selama proses perkuliahan yang sangat berharga, serta bantuannya selama proses penelitian.
7. Yogi Ananta Suria, terimakasih atas dukungan dan bantuannya dari masa kuliah, penelitian hingga penyusunan skripsi ini
8. Partner penelitian Zia Assya dan Shamad, terimakasih atas konsistensi, semangat, dan kerjasamanya selama penelitian. Sukses selalu.
9. Mutia Putri, Zia Assya, dan Dian Islamiah, sahabat kuliahku yang selalu mendukung, dan kebersamai dalam situasi apapun semasa kuliah.
10. Teman-teman Jegeg Sanggar, tempat menyalurkan kreativitas dan curahan hati yang juga selalu mendukung selama masa perkuliahan. terimakasih selalu kebersamai.
11. Teman-teman seperjuangan Biologi angkatan 2018, terima kasih atas dukungan, bantuan dan kebersamaannya selama perkuliahan, terkhusus Fatimah tussahra dan Andi Saripada A. terima kasih dukungan dan kerjasamanya selama kuliah. Sukses selalu.
12. Andi Tasya Nihla dan Novita Adelia yang telah banyak membantu dan selalu direpotkan khususnya selama masa perkuliahan terimakasih banyak. Sukses selalu.
13. Miftahuljannah, Rahmatunnazifah, Irfan Prasetya dan Dwi Nurul Aulia, terimakasih juga selalu ada, membantu, mendukung selama masa perkuliahan. Sukses selalu.

Pada akhirnya penulis berterima kasih kepada semua pihak yang telah berkontribusi hingga karya tulis ini terselesaikan. Terima kasih yang sebesar-besarnya. Semoga Tuhan memberkati kita semua.

Makassar, 17 Maret 2023

Penulis



## ABSTRAK

Probiotik ialah mikroorganisme hidup yang mampu memberikan manfaat bagi tubuh inangnya, dapat ditemukan pada saluran pencernaan dan termasuk dalam golongan Bakteri Asam Laktat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi isolat bakteri probiotik yang diperoleh dari saluran pencernaan Ayam Buras *Gallus domesticus* secara molekuler menggunakan primer PCR 63F dan 1387R dalam amplifikasi Gen 16SrRNA. Uji biokimia dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat fisiologis koloni bakteri. Identifikasi secara molekuler (genotipik) dimulai dari ekstraksi DNA, kemudian diamplifikasi dengan primer universal 16SrRNA (63f dan 1387R) menggunakan PCR, lalu dielektroforesis dan dilakukan sekuensing dengan metode *Sanger dideoxy*. Hasil sekuens gen dinalisis untuk pencarian homologi menggunakan program BLAST. Hasil uji biokimia yakni koloni bersifat katalase negatif, non-motil, heterofermentatif. Hasil amplifikasi dengan PCR menunjukkan ampikon 1300 bp dari sekuens DNA gen 16SrRNA. Sedangkan hasil analisis sekuens dari bakteri probiotik isolat PaPJ menunjukkan persentase kemiripan yang tinggi (98.38%) dengan *Enterococcus faecalis* strain L1C1M8, sedangkan isolat PaPB menunjukkan persentase kemiripan (98.40%) dengan *Enterococcus faecalis* strain CE\_18\_3.

**Kata kunci:** Identifikasi, Bakteri Probiotik, Ayam Buras *Gallus domesticus*, Gen 16SrRNA.

## ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that are able to provide benefits to the host's body, can be found in the digestive tract and include to Lactic Acid Bacteria group. The purpose of this study was to identify isolates of probiotic bacteria obtained from the digestive tract of Free-range Chicken *Gallus domesticus* molecularly using PCR primers 63F and 1387R in the amplification of the 16S rRNA Gene. Biochemical tests are carried out to determine the physiological properties of bacterial colonies. Molecular (genotypic) identification starts from DNA extraction, then amplified with a universal primer of 16S rRNA (63f and 1387R) using PCR, then electrophoresis and sequencing is carried out using the *Sanger dideoxy* method. Dialysis gene sequence results for homology search using the BLAST program. The results of biochemical tests are catalase negative, non-motile, heterofermentative colonies. The PCR amplification results showed 1300 bp amplicon from DNA sequence of the 16S rRNA gene. Meanwhile, the results of sequence analysis of probiotic bacteria PaPJ isolates showed a high percentage similarity (98.38%) with *Enterococcus faecalis* strain L1C1M8, while PaPB isolates showed a percent similarity (98.40%) with *Enterococcus faecalis* strain CE\_18\_3.

**Key words:** Identification, Probiotic Bacteria, *Gallus domesticus*, 16S rRNA Gene.

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI .....</b>	<b>iii</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN.....</b>	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xvi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
I.1 Latar Belakang .....	1
I.2 Tujuan Penelitian .....	4
I.3 Manfaat penelitian.....	4
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
II.1 Probiotik.....	5
II.2 Bakteri Probiotik.....	8
II.3 Bakteri Probiotik dari Saluran Pencernaan Ayam Buras <i>Gallus domesticus</i> .....	10

II.4 Identifikasi Bakteri .....	11
II.4.1 Karakterisasi Fenotipik dan Biokimia.....	12
II.4.2 Identifikasi Molekuler Berbasis PCR Untuk Amplifikasi dan Sekuensing gen 16SrRNA .....	12
II.5 Tahapan Metode Identifikasi Molekuler Berbasis PCR Untuk Amplifikasi Gen 16SrRNA .....	14
II.5.1 Ekstraksi DNA .....	14
II.5.2 Amplifikasi DNA dengan Metode PCR.....	15
II.5.3 Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis .....	17
II.5.4 Sekuensing DNA.....	18
II.5.5 Analisis Sekuens DNA.....	18
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>20</b>
III.1 Alat .....	20
III.2 Bahan.....	20
III.3 Cara Kerja.....	21
III.3.1 Sterilisasi Alat.....	21
III.3.2 Pembuatan Media .....	21
III.3.3 Kultivasi Bakteri .....	22
III.3.4 Uji Biokimia Pada Bakteri Probiotik .....	23
III.3.5 Ekstraksi DNA.....	24
III.3.6 Amplifikasi Gen 16SrRNA.....	25
III.3.7 Deteksi Produk PCR dengan Elektroforesis .....	26
III.3.8 Sekuensing DNA .....	26
III.3.9 Analisis Data.....	26

<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>27</b>
IV. 1 Uji Biokimia.....	27
IV. 1.1 Uji TSIA .....	27
IV. 1.2 Uji Motilitas.....	28
IV. 1.3 Uji Katalase .....	29
IV. 1.4 Uji SCA .....	30
IV. 1.5 Uji Mr ( <i>Methyl-Red</i> ).....	30
IV. 1.6 Uji Vp ( <i>Voges Proskauer</i> ) .....	31
IV. 2 Analisis Molekuler Berbasis Gen 16SrRNA.....	32
IV. 2.1 Ekstraksi DNA.....	32
IV. 2.2 Amplifikasi DNA dengan Metode PCR dan Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis .....	33
IV. 2.3 Analisis Sekuens DNA Gen 16SrRNA Bakteri.....	36
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>40</b>
V.1 Kesimpulan.....	40
V.2 Saran .....	40
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>41</b>

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Tabel Hasil Uji Biokimia Bakteri Probiotik isolat PaPJ dan PaPB .....	27
2. Tabel Hasil Analisis Sekuens DNA Bakteri Probiotik Isolat PaPJ.....	37
3. Tabel Hasil Analisis Sekuens DNA Bakteri Probiotik Isolat PaPB.....	37

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Komponen dan Tahapan PCR.....	16
2. Hasil Uji TSIA Bakteri Probiotik Isolat PaPJ dan PaPB .....	27
3. Hasil Uji Motilitas Bakteri Probiotik Isolat PaPJ dan PaPB.....	28
4. Hasil Uji Katalase Bakteri Probiotik Isolat PaPJ dan PaPB .....	29
5. Hasil Uji SCA Bakteri Probiotik Isolat PaPJ dan PaPB .....	30
6. Hasil Uji Mr Bakteri Probiotik Isolat PaPJ dan PaPB .....	31
7. Hasil Uji Vp Bakteri Probiotik Isolat PaPJ dan PaPB .....	31
8. Hasil Ekstraksi DNA Bakteri Probiotik Isolat PaPJ dan PaPB.....	33
9. Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis .....	35

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Skema Kerja Penelitian .....	46
2. Skema Kerja Kultivasi Isolat Bakteri Probiotik.....	47
3. Skema Kerja Uji Biokimia Bakteri Probiotik .....	48
4. Skema Kerja Ekstraksi DNA .....	49
5. Skema Kerja Amplifikasi DNA dengan PCR.....	50
6. Skema Kerja Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis .....	51
7. Dokumentasi Kultivasi Isolat Bakteri Probiotik .....	52
8. Dokumentasi Uji Biokimia Bakteri Probiotik Isolat PaPJ dan PaPB .....	53
9. Dokumentasi Ekstraksi DNA Bakteri Probiotik Isolat PaPJ dan PaPB.....	54
10. Dokumentasi Amplifikasi DNA dengan PCR .....	55
11. Dokumentasi Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis.....	56
12. Hasil Analisis Sekuens DNA Isolat PaPJ dan PaPB.....	57



# BAB I

## PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang

Probiotik saat ini telah menjadi topik penelitian yang sangat menarik untuk dibahas lebih lanjut karena ternyata manfaatnya bahkan bisa membantu kelangsungan hidup organisme. Istilah probiotik berasal dari bahasa Yunani yaitu *pro bios*, yang berarti untuk kehidupan. Diperkenalkan pada tahun 1965 oleh Lilly dan Stillwell, yang mengidentifikasi probiotik sebagai "organisme atau zat yang mempengaruhi keseimbangan mikroflora usus". Pada tahun 2002, Organisasi Pangan dan Pertanian/Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) mendefinisikan probiotik sebagai "mikroorganisme hidup yang bila ada dalam jumlah yang memadai, memberikan manfaat bagi tubuh inangnya". Probiotik diyakini melekat pada sel epitel usus, mencegah perkembangan mikroorganisme berbahaya dengan memproduksi zat anti bakteri termasuk bakteriosin dan asam organik.

Probiotik dapat berupa bakteri dan juga *yeast*, namun golongan bakteri diketahui lebih potensial dibandingkan dengan ragi. Ragi dalam produk probiotik secara komersial terbatas pada satu strain yaitu *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii*, sedangkan bakteri meliputi kelompok Bakteri Asam Laktat (BAL) dan bakteri *non*-BAL seperti *Bacillus*, *Propionibacterium*, dan *Escherichia coli*. BAL dianggap memiliki catatan keamanan yang sangat baik sehingga paling banyak dimanfaatkan khususnya *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (Huys *et al.*, 2013).

Salah satu sumber probiotik yang dapat diisolasi dari hewan yaitu pada saluran pencernaan ayam buras *Gallus domesticus*. Berdasarkan penelitian Husain

*et al* (2020) diketahui bahwa sumber bakteri asam laktat dapat berasal dari ayam peliharaan yang dipelihara di luar ruangan, karena habitatnya di alam bebas memungkinkan tingginya keanekaragaman hayati bakteri di saluran pencernaannya, dan disebutkan pula dalam Yulianto & Lokapirnasari (2018) mikroflora pada saluran pencernaan ayam buras *Gallus domesticus* lebih beragam daripada ayam pedaging atau ayam petelur yang pakannya sering dilengkapi dengan antibiotik.

Berdasarkan penelitian Yulianto dan Lokapirnasari (2018) diketahui bahwa terdapat tiga BAL yang berhasil diisolasi dari saluran pencernaan ayam kampung meliputi *L. plantarum*, *L. acidophilus* dan *L. casei*. Penelitian lainnya oleh Husain *et al* (2017) juga memperoleh tujuh isolat bakteri probiotik dari saluran pencernaan ayam buras, dua isolat diantaranya bersifat potensial sebab memiliki pertumbuhan yang stabil dan dapat menghambat bakteri patogen *E. coli* dan *Salmonella typhi* dan pada Husain *et al* (2020) ditemukan *Bacillus subtilis* pada bagian dinding dalam usus.

Banyak peneliti yang berantusias untuk mencari probiotik tersebut dengan mengisolasi dan selanjutnya diidentifikasi untuk mengetahui jenisnya sehingga pemanfaatannya dapat diterapkan lebih luas dalam bidang kesehatan, farmasi, peternakan, perikanan ataupun penelitian-penelitian lanjutan lainnya.

Identifikasi probiotik tersebut memerlukan pengetahuan terkait karakteristik morfologi, biokimia, fisiologis, dan genetiknya yang kemudian dikelompokkan berdasarkan fenotipik dan genotipik (Zourob *et al.*, 2008). Namun metode fenotipik tidak selalu dapat mengidentifikasi mikroorganisme secara jelas ke tingkat spesies atau tingkat strain (tingkat keakuratannya rendah), membutuhkan waktu yang lama dan biaya yang tinggi maka dari itu diperlukan metode alternatif

secara genotipik atau dengan teknik biologi molekuler yang dinilai memiliki keakuratan yang tinggi (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

Seiring perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi metode identifikasi juga telah berkembang hingga berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, yaitu dengan analisis sekuensing gen 16SrRNA yang dipelopori oleh Carl Woese dan George E. Fox pada tahun 1977 dimana sangat spesifik untuk setiap spesies bakteri dan ini menjadikannya target yang ideal untuk identifikasi. Dalam Noer (2021) metode ini diawali dengan ekstraksi DNA dari isolat bakteri, kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi gen menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan menggunakan primer universal gen 16SrRNA, analisis fragmen gen dengan sekuensing, kemudian hasil sekuensing dianalisis dengan program BLAST di situs NCBI untuk mengetahui jenis dari isolat bakteri tersebut.

Gen 16SrRNA memiliki berbagai keunggulan yaitu bersifat ubikuitas dengan fungsinya yang bersifat identik pada setiap organisme, dapat berubah sesuai jarak evolusinya sehingga dapat digunakan sebagai kronometer evolusi, memiliki bagian yang bersifat konservatif untuk mengontruksi pohon filogenetik universal, berukuran sekitar 1550 pasang basa dan sekitar 500 basa di bagian ujung sekuens merupakan daerah yang disebut dengan *hypervariable region* (lestari) yang memudahkan untuk mengidentifikasi jenis bakteri (Akihary dan Kolondam, 2020).

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen 16SrRNA adalah primer Forward 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan primer Reserval 1387R (5'-GGGCGGTGTGTACAAGGC-3'). Primer 63F dan primer

1387R memiliki spesifisitas yang tinggi dalam mengidentifikasi berbagai macam bakteri termasuk bakteri probiotik dari golongan *Lactobacillus* (Marchesi *et al.*, 1998). Isolat bakteri asam laktat penghasil enzim protease *Pediococcus pentosaceus* juga berhasil diidentifikasi menggunakan primer ini (Afriani *et al.*, 2018). Penelitian yang dilakukan oleh Fredriksson *et al.*, (2013) menunjukkan bahwa primer 63F dan primer 1387R dapat mengidentifikasi berbagai macam genus bakteri dibandingkan dengan primer 27F dan 1492R.

Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian ini untuk mengidentifikasi isolat bakteri probiotik yang diisolasi dari usus ayam buras *Gallus domesticus* menggunakan primer PCR 63F dan 1387R untuk amplifikasi Gen 16SrRNA.

## **I.2 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi isolat bakteri probiotik yang diperoleh dari saluran pencernaan Ayam Buras *Gallus domesticus* secara molekuler menggunakan primer PCR 63F dan 1387R dalam amplifikasi Gen 16SrRNA.

## **I.3 Manfaat penelitian**

Adapun manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah mengenai hasil identifikasi bakteri probiotik yang diisolasi dari ayam buras *Gallus domesticus*.

## **I.4 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober - Desember 2022. Penyiapan sediaan probiotik dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi dan preparasi DNA sampel dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains, Science Building, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **II.1 Probiotik**

Kepercayaan pada efek menguntungkan dari jenis bakteri tertentu pada tubuh manusia sudah ada sejak zaman kuno. Diketahui bahwa Plinius the Elder menganjurkan minum minuman yang terbuat dari susu fermentasi untuk meringankan masalah perut. Istilah probiotik berasal dari bahasa Yunani pro bios, yang berarti untuk kehidupan. Itu diperkenalkan pada tahun 1965 oleh Lilly dan Stillwell, yang mengidentifikasi probiotik sebagai "organisme atau zat yang mempengaruhi keseimbangan mikroflora usus". Pada tahun 1989, Fuller melihat manfaat probiotik dan menggambarkannya sebagai "suplemen makanan mikrobiologis hidup". Pada tahun 2002, Organisasi Pangan dan Pertanian/Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) mendefinisikan probiotik sebagai "mikroorganisme hidup yang bila ada dalam jumlah yang memadai, memberikan manfaat bagi tubuh inangnya" (Olas, 2020).

Pada awal abad kedua puluh, penelitian tentang probiotik terutama difokuskan pada spesies *Lactobacillus* yang ditemukan dalam produk susu, misalnya *Lactobacillus casei* (strain probiotik pertama yang diisolasi di Jepang), dan pada *Lactobacillus acidophilus* yang setara di Barat. Pada tahun 1970, Ilyich Metchnikoff (yang biasanya dianggap sebagai pendiri probiotik) melaporkan bahwa jumlah Lactobacilli dalam saluran pencernaan memiliki pengaruh terhadap kesehatan inang. *Lactobacillus* adalah salah satu genera utama mikroorganisme probiotik dengan sejarah panjang penggunaan yang aman; itu diakui oleh US Food

and Drug Administration (FDA) untuk konsumsi, dan disetujui untuk digunakan dalam produk susu. Bakteri probiotik selalu ada pada manusia dan secara alami ada di saluran pencernaan dan mulut, mereka dikonsumsi di seluruh dunia bersama dengan produk makanan tradisional. Mereka juga telah banyak digunakan untuk menjaga kesegaran makanan seperti salami, keju, kecap atau asinan kubis selama ratusan, atau bahkan ribuan tahun (Olas, 2020).

Probiotik diyakini melekat pada sel epitel usus, mencegah perkembangan mikroorganisme berbahaya dengan memproduksi zat anti bakteri termasuk bakteriosin dan asam organik. Bagian kuantitatif bakteri dalam saluran pencernaan bervariasi, dengan jumlah *Bifidobacteria* di usus besar manusia berkisar antara  $8 \times 10^4$  hingga  $2,5 \times 10^{13}$  sel (rata-rata  $1,6 \times 10^{10}$  sel), dan jumlah bakteri *Lactobacillus* mulai dari  $4 \times 10^4$  hingga  $3,2 \times 10^{12}$  (rata-rata  $4 \times 10^9$  sel). Dua belas spesies *Bifidobacteria* diketahui terdapat pada manusia, terutama *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. animalis* dan *B. bifidum*; *Bifidobacteria* adalah salah satu genera mikroorganisme pertama yang menjajah saluran pencernaan steril bayi baru lahir, dan diyakini merupakan kelompok mikroflora usus terbesar, mewakili hingga 95% dari total populasi mikroba selama menyusui. Peraturan WHO menyatakan bahwa jumlah sel hidup dalam makanan probiotik pada saat konsumsi manusia tidak boleh lebih rendah dari  $10^6$  sel per 1 mL atau 1 g produk, sedangkan dosis terapeutik adalah  $10^8$ - $10^9$  sel dalam 1 mL atau 1 g produk. Mengingat bahwa mikroorganisme harus tetap hidup dan tidak boleh dibunuh dengan melewati saluran pencernaan, probiotik harus tahan terhadap aksi asam lambung dan garam empedu. Setelah melewati penghalang kimia ini, probiotik harus menempel pada permukaan usus, di mana fungsi peningkatan kesehatannya dapat diwujudkan.

Selain itu, jika mikroorganisme probiotik tidak berkoloni di usus, konsumsi produk probiotik secara berulang mungkin diperlukan (Olas, 2020).

Berdasarkan Abdel-Megeed (2021) Probiotik memiliki beberapa karakteristik ideal yakni :

1. Dapat memberikan pengaruh yang berguna pada inang target, seperti meningkatkan pertumbuhan hewan atau menjadi lebih toleran terhadap penyakit apa pun.
2. Tidak menyebabkan patogen atau toksin bagi inangnya.
3. Mampu bertahan hidup dan bermetabolisme di lingkungan gastrointestinal seperti pH rendah, asam organik di usus, dan sekresi empedu.
4. Mampu menempel pada jaringan target dan sel epitel di usus.
5. Mudah dikarakterisasi dengan uji mikrobiologi klinis

Probiotik dapat meningkatkan respon imun seluler nonspesifik melalui aktivasi sel natural killer, makrofag dan pelepasan berbagai sitokin. Mereka juga dapat meningkatkan sistem kekebalan mukosa usus dengan meningkatkan jumlah sel IgA. Selain itu, probiotik juga dapat membantu proses pencernaan dan pemecahan laktosa, meningkatkan penyerapan mineral seperti kalsium, seng, besi dan mangan, dan meningkatkan sintesis banyak vitamin, termasuk thiamin, riboflavin, niasin, asam pantotenat dan vitamin K. Probiotik berperan penting dalam pengobatan berbagai penyakit, seperti penyakit hati, diare, dan gastroenteritis. Probiotik juga telah terbukti memiliki sifat anti-proliferatif, pro-apoptosis dan anti-oksidatif (Olas, 2020).

## II.2 Bakteri Probiotik

Bakteri probiotik dicirikan sebagai bakteri gram positif, tidak membentuk spora, katalase negatif tetapi kadang-kadang terdeteksi katalase semu pada kultur yang ditumbuhkan pada konsentrasi gula rendah, anaerob aerotoleran, tahan asam, fermentatif, berbentuk batang dan bulat, habitatnya kaya nutrisi dan komposisi basa DNA kurang dari 50% mol G+C (Harzallah dan Belhadj, 2013).

Berikut bakteri probiotik yang umumnya dijumpai pada tubuh suatu individu, yaitu:

### 1. Bakteri Asam Laktat

#### a. *Lactobacillus*

*Lactobacillus* merupakan probiotik paling menonjol dari kelompok bakteri asam laktat. Perubahan komposisi, keragaman, dan fungsi mikrobiota usus oleh spesies probiotik telah dipelajari dengan menggunakan alat dan teknik termasuk metode yang ditargetkan, tergantung kultur, dan sekuens metagenomik. Namun, beberapa penelitian telah menunjukkan hubungan spesies probiotik dengan komposisi mikrobiota usus yang berubah. Analisis metagenomik pada campuran probiotik *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (*L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, dan *Bifidobacterium bifidum*) secara signifikan mengubah komposisi mikrobiota usus dan peningkatan sensitivitas insulin. Strain probiotik *Lactobacillus* telah ditemukan untuk meningkatkan fungsi penghalang perkembangbiakan bakteri berbahaya. Selain itu, spesies *Lactobacillus* komensal dapat memulihkan homeostasis pada gangguan usus dan memainkan peran protektif terhadap penyakit inflamasi (Azad *et al.*, 2018).

#### b. *Enterococcus*

*Enterococcus* adalah bakteri Gram-positif dalam kelompok bakteri asam laktat. Beberapa strain *Enterococcus* mengerahkan disbiosis yang diinduksi oleh antibiotik dan bertindak sebagai antitumor atau agen antikanker



dan memodulasi sistem kekebalan tubuh. Kultur strain *E. faecium* dari epitel usus manusia meningkatkan efek bakterisidal terhadap *E. coli* enteroaggregative, kerusakan membran, dan lisis sel (Azad *et al.*, 2018).

### c. Bakteri asam laktat lainnya

Beberapa jenis bakteri asam laktat lainnya yang merupakan bakteri probiotik diantaranya yaitu *Lactococcus lactis* subs. *lactis*, *Leuconostoc citreum*, *Le. mesenteroides* subsp. *Cremoris*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus acidilactici*, *Pd. Pentosaceus* dan *Sporolactobacillus inulinus* (Huys *et al.*, 2013).

## 2. *Bifidobacterium*

*Bifidobacterium* merupakan probiotik yang dapat berperan dalam meringankan berbagai penyakit dengan mengubah komposisi mikrobiota usus. Seperti *Lactobacillus* lainnya, *Bifidobacterium* juga dapat menghambat bakteri berbahaya, meningkatkan fungsi penghalang gastrointestinal, dan menekan proinflamasi (Azad *et al.*, 2018). Selain itu, *Bifidobacterium* mampu mengubah fungsi sel dendritik untuk mengatur homeostasis kekebalan usus menjadi antigen dan bakteri yang tidak berbahaya atau memulai tindakan perlindungan terhadap patogen serta memiliki potensi untuk mengendalikan berbagai penyakit usus, kanker, dan alergi (Fu *et al.*, 2017). Jenis-jenis *Bifidobacterium* yang terpenting sebagai probiotik diantaranya *Bf. Adolescentis*, *Bf. animalis* subsp. *Lactis*, *Bf. bifidum*, *Bf. breve*, *Bf. longum* subsp. *Infantis* dan *longum* subsp. *Longum* (Huys *et al.*, 2013).

## 3. Spesies Bakteri Lainnya

*Escherichia coli* merupakan bakteri Gram-negatif dalam kelompok Enterobacteriaceae dan termasuk strain probiotik terkenal dengan beberapa efek menguntungkan pada homeostasis mikrobiota usus. Galur nonpatogenik *Escherichia coli* Nissle (EcN) adalah salah satu galur probiotik yang paling

banyak digunakan dalam homeostasis mikrobiota usus. EcN dapat merangsang produksi  $\beta$ -defensin 2 manusia, yang dapat melindungi penghalang mukosa terhadap adhesi dan invasi oleh komensal patogen (Azad *et al.*, 2018). Jenis-jenis bakteri lainnya yang terpenting sebagai probiotik diantaranya *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Pr. freudenreichii* subsp. *shermanii* dan *Pr. jensenii* (Huys *et al.*, 2013).

### **II.3 Bakteri Probiotik dari Saluran Pencernaan Ayam Buras *Gallus domesticus***

Salah satu sumber probiotik yang dapat diisolasi yang berasal dari hewan yaitu pada saluran pencernaan ayam buras *Gallus domesticus* (Yulianto & Lokapirnasari, 2018; Husain, Gunawan and Sulfahri, 2020). Sumber bakteri asam laktat yang potensial dapat berasal dari ayam peliharaan yang dipelihara di luar ruangan karena habitatnya di alam bebas memungkinkan tingginya keanekaragaman hayati bakteri di saluran pencernaannya (Husain, Gunawan dan Sulfahri, 2020). Dan disebutkan pula dalam Yulianto & Lokapirnasari (2018) ayam buras *Gallus domesticus* adalah *free-range*, mikroflora pada saluran pencernaannya lebih beragam daripada ayam pedaging atau ayam petelur yang pakannya sering dilengkapi dengan antibiotik.

Beberapa bakteri yang ditemukan pada saluran pencernaan ayam diantaranya yaitu, *L. plantarum*, *L. acidophilus* dan *L. casei* pada bagian esofagus; *L. plantarum* dan *L. casei* dari bagian proventrikulus; dan *L. plantarum*, *L. acidophilus* dan *L. casei* dari ventrikulus (Yulianto & Lokapirnasari, 2018). Pada bagian dinding dalam usus ditemukan *Bacillus subtilis* (Husain, Gunawan dan Sulfahri, 2020). Sedangkan pada ileal dan cecal ditemukan *Lactobacillus salivarius*, *L. aviarius*, *L. crispatus*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *E. coli*,

*Gallibacterium anatis*, *Clostridium lactatifermentans*, *Ruminococcus torques*, *Bacteroides vulgatus*, dan *Alistipes finegoldii*.

Fungsi probiotik pada usus ayam dapat meningkatkan kualitas kesehatan ayam dalam hal ini dapat diketahui melalui penelitian yang dilakukan Husain *et al* (2017) pemberian probiotik pada makanan ayam pedaging (broiler) mampu meningkatkan pertambahan bobot badan dan kualitas daging ayam broiler, sebab probiotik mampu meningkatkan perbaikan tubuh dengan meningkatkan daya cerna dan penyerapan nutrisi di saluran pencernaan.

#### **II.4 Identifikasi Bakteri**

Identifikasi adalah menentukan identitas suatu isolat dengan mencocokkan karakteristiknya dengan spesies yang telah diidentifikasi sebelumnya. Identifikasi bakteri memerlukan pengetahuan terkait karakteristik morfologi, biokimia, fisiologis, dan genetiknya. Ciri-ciri tersebut dapat dikelompokkan menjadi fenotipik dan genotipik (Zourob *et al.*, 2008). Identifikasi mikroorganisme dengan metode fenotipik meliputi karakterisasi morfologi, fisiologi, dan biokimia. Namun metode fenotipik tidak selalu berguna untuk mengidentifikasi mikroorganisme secara jelas ke tingkat spesies atau tingkat strain (tingkat keakuratannya rendah), membutuhkan waktu yang lama dan biaya yang tinggi maka dari itu diperlukan metode alternatif secara genotipik atau dengan teknik biologi molekuler yang dinilai memiliki keakuratan yang tinggi (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

Secara prosedural, identifikasi disarankan untuk dimulai dengan kategorisasi yang luas secara fenotipik (misalnya pewarnaan Gram) dan dilanjutkan ke pengujian yang lebih spesifik secara genotipik yang mengarah pada penentuan genus dan spesies isolat (Zourob *et al.*, 2008).

#### **II.4.1 Karakterisasi Fenotipik dan Biokimia**

Pada Pradhan dan Tamang (2019) dinyatakan bahwa isolat bakteri dikarakterisasi secara fenotipik untuk identifikasi dugaan, dan pengelompokan dilakukan berdasarkan morfologi sel, reaksi Gram, morfologi koloni, uji katalase, uji sporulasi, produksi gas dari glukosa, dan produksi amonia dari arginin. Uji fisiologis meliputi pertumbuhan pada pH, suhu, dan toleransi garam yang berbeda. Karakterisasi biokimia isolat seperti uji fermentasi gula, uji IMViC (Indole, Methyl red; Voges-Proskauer dan Sitrat) khusus untuk isolat Gram-negatif, uji reduksi nitrat, dan uji urease juga dilakukan dengan menggunakan metode Hammes dan Hertel (2003).

#### **II.4.2 Identifikasi Molekuler Berbasis PCR Untuk Amplifikasi dan Sekuensing gen 16SrRNA**

PCR merupakan salah satu teknik paling sensitif yang tersedia untuk mendeteksi target bakteri. Identifikasi DNA bakteri berbasis PCR melalui amplifikasi dan sekuensing gen 16SrRNA telah menjadi metode molekuler standar, baik di laboratorium maupun dalam pengaturan klinis. Gen 16SrRNA sangat spesifik untuk setiap spesies bakteri dan ini menjadikannya target yang ideal untuk identifikasi. Metode standar melibatkan amplifikasi PCR dari gen 16SrRNA, diikuti dengan pengurutan dan perbandingan dengan database yang dikenal untuk identifikasi. Metode berbasis PCR tidak hanya lebih cepat daripada metode berbasis kultur konvensional tetapi juga membantu dalam identifikasi bakteri yang sulit tumbuh dalam kondisi laboratorium (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

Gen 16SrRNA memiliki berbagai keunggulan yaitu bersifat ubikuitas dengan fungsinya yang bersifat identik pada setiap organisme, gen 16SrRNA dapat berubah sesuai jarak evolusinya sehingga dapat digunakan sebagai

kronometer evolusi, gen 16S rRNA memiliki bagian yang bersifat konservatif untuk mengonstruksi pohon filogenetik universal, serta memiliki bagian hyper variable region yang memudahkan untuk mengidentifikasi jenis bakteri (Akihary dan Kolondam, 2020).

Menurut Rashid *et al.* (2020), produk hasil amplifikasi dari gen 16SrRNA berada pada ukuran sekitar 1542 bp. Selain itu, merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Marlida *et al.*, (2020) menunjukkan produk PCR dari gen 16SrRNA menghasilkan amplicon pada ukuran 1400 bp, sedangkan pada penelitian Jalil *et al.* (2019) menunjukkan hasil amplicon 10 sampel pada ukuran sekitar 1300 bp hingga 1500 bp.

Keberhasilan teknik PCR lebih didasarkan kepada kesesuaian primer dan efisiensi dan optimasi proses PCR. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi. Menurut Marchesi (1998) yang mengklaim bahwa pasangan dari desain primer PCR 63F dan 1387R untuk amplifikasi gen 16SrRNA dari bakteri telah dievaluasi dan diuji secara sistematis dari aspek spesifisitas serta efisiensinya dari berbagai jenis bakteri dan sampel pada lingkungan yang menyatakan bahwa pasangan primer tersebut dikatakan lebih bermanfaat untuk amplifikasi gen 16SrRNA dalam ekologi dan studi sistematis. Primer ini mampu mengidentifikasi organisme coryneform dan genus *Micrococcus* (Gram-positif, guanin tinggi (G) dan sitosin (C) bakteri), *Eubacterium*, dan proteobacteria. Selain itu, 63F ditemukan memiliki potensi hibridisasi yang lebih besar dibandingkan daripada primer lain (27F dan 1392R) dimana primer tersebut

tidak dapat mengamplifikasikan daerah yang terkonservasi secara optimal dibandingkan pasangan primer 63F dan 1387R.

## **II.5 Tahapan Metode Identifikasi Molekuler Berbasis PCR Untuk Amplifikasi Gen 16SrRNA**

### **II.5.1 Ekstraksi DNA**

Ekstraksi DNA adalah suatu metode untuk memurnikan DNA dengan menggunakan metode fisik dan/atau kimia dari suatu sampel yang memisahkan DNA dari membran sel, protein, dan komponen seluler lainnya. Friedrich Miescher pada tahun 1869 melakukan isolasi DNA untuk pertama kalinya. Penggunaan teknik isolasi DNA harus mengarah pada ekstraksi yang efisien dengan kuantitas dan kualitas DNA yang baik, murni dan bebas dari kontaminan, seperti RNA dan protein. Ekstraksi DNA melibatkan lisis sel dan pelarutan DNA, yang diikuti dengan metode kimia atau enzimatik untuk menghilangkan makromolekul, lipid, RNA, atau protein. Teknik ekstraksi DNA meliputi ekstraksi organik (metode fenol-kloroform), metode nonorganik (perlakuan penggaraman dan proteinase K), dan metode adsorpsi (membran silika-gel) (Gupta, 2019).

Prinsip ekstraksi DNA ada dua meliputi (Marwayana, 2015);

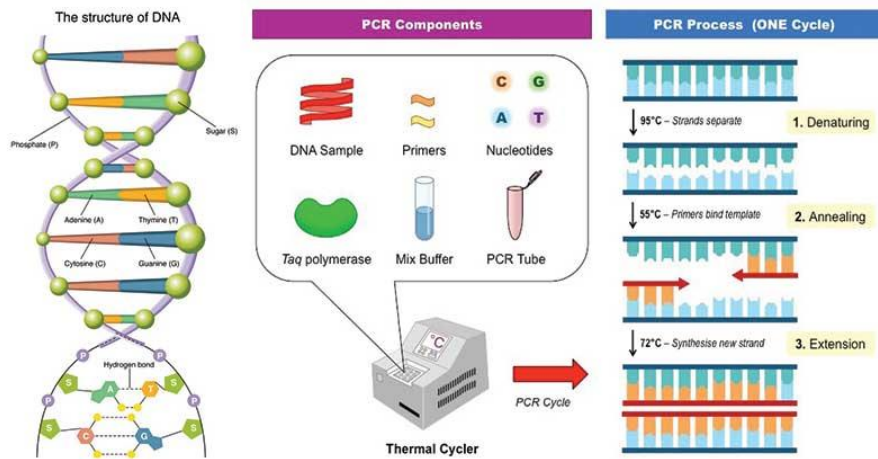
- a. Sentrifugasi yaitu teknik untuk memisahkan campuran berdasarkan berat molekul komponennya. Molekul yang mempunyai berat molekul besar akan berada di bagian bawah tabung dan molekul ringan akan berada pada bagian atas tabung Hasil sentrifugasi akan menunjukkan dua macam fraksi yang terpisah, yaitu supernatan pada bagian atas dan pelet pada bagian bawah.
- b. Presipitasi merupakan langkah yang dilakukan untuk mengendapkan suatu komponen dari campuran.

Tahapan Ekstraksi dan Purifikasi meliputi, Perusakan dinding dan membran sel (Lisis sel) menggunakan enzim lisozim. Prinsip metode lisis adalah perusakan

dinding sel tanpa harus merusak DNA yang diinginkan. Purifikasi DNA dari komponen lain dengan Memisahkan DNA dari komponen seluler lainnya seperti protein, lipid, RNA, dan lain-lain serta secara efektif menginaktivasi *endogenous nucleases* (enzim DNase) dan mencegahnya dari memotong DNA genom adalah langkah kunci dalam proses purifikasi. Menggunakan kit purifikasi DNA komersial DNase dapat diinaktivasi dengan panas atau *chelating agents*. DNA yang terpresipitasi mengandung garam asetat. Lalu DNA tersebut “dicuci” dengan larutan etanol 70% untuk menghilangkan garam dan impuritieslain yang larut air. Terakhir DNA yang bersih diresuspensi dalam buffer untuk meyakinkan stabilitas dan penyimpanan jangka panjang. Buffer yang umum digunakan untuk resuspensi yaitu 1xTE.

### **II.5.2 Amplifikasi DNA dengan Metode PCR**

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah istilah dan teknik ilmiah dalam biologi molekuler yang mampu menghasilkan salinan DNA spesifik dari dua sekuens oligodeoksinukleotida pendek (juga disebut primer) melalui reaksi termal berulang yang bergantung pada polimerase. Secara umum, PCR didasarkan pada hubungan kuantitatif antara jumlah urutan target titik awal dan jumlah produk amplifikasi PCR dalam satu siklus. Korelasi ini menciptakan laju pertumbuhan secara eksponensial yang meningkatkan produk yang sama persis yang terakumulasi pada setiap siklus (karena efisiensi 100% reaksi terjadi dengan metode tersebut) (Giri Putra et al., 2020).



**Gambar 1.** Komponen dan Tahapan PCR (Giri Putra et al., 2020).

Teknologi PCR didasarkan pada urutan DNA yang diamplifikasi dengan DNA sintetis yang memiliki dua ujung rantai yang melengkapinya dua primer oligonukleotida. Secara *in vitro* deteksi urutan DNA (*template*) diamplifikasi dalam aksi enzimatik. Keseluruhan proses PCR berlangsung dengan beberapa siklus, satu siklus terdiri dari 3 langkah: langkah pertama adalah denaturasi template DNA secara terus menerus dalam kondisi suhu yang tinggi, yaitu pada suhu 93-94°C selama 5 menit dalam kondisi rantai terdenaturasi; langkah kedua adalah *annealing* 2 primer oligonukleotida sintetis dengan rantai DNA cetakan pada suhu 55°C selama 1 menit; langkah ketiga adalah perpanjangan/ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit yang diikuti dengan elongasi akhir selama 5 menit dengan 4 jenis substrat dNTP. Pada tahap perpanjangan, rantai primer sepanjang arah 5'-3' membentuk rantai baru secara komplementer dengan DNA *template* dengan menggunakan DNA Taq polimerase. Setelah siklus ini, rantai baru disintesis dan dapat dilanjutkan sebagai cetakan DNA yang bisa didaur ulang. Selama siklus, jumlah produk yang diamplifikasi meningkat secara eksponensial, dan siklus salinan gen tunggal bisa mencapai 25-30 kali (Suardana, 2014; Yu, Cao dan Ji,



2017). Langkah-langkah reaksi PCR sederhana, tetapi operasi spesifiknya rumit, seperti penentuan suhu penempelan, ekstensi, dan jumlah siklus.

Ada banyak keuntungan dari penggunaan PCR. Pertama, sebagai teknik yang sederhana untuk dipahami dan digunakan, dan menghasilkan hasil dengan cepat. Kedua, teknik ini sangat sensitif dengan potensi menghasilkan jutaan hingga miliaran salinan produk tertentu untuk pengurutan, kloning, dan analisis. Meskipun PCR memiliki kelebihan dan sangat penting akan hasil yang didapatkan dari penggunaannya, namun PCR memiliki keterbatasan. Karena PCR adalah teknik yang sangat sensitif, segala bentuk kontaminasi sampel dengan jumlah jejak DNA yang sama dapat menghasilkan hasil yang keliru. Selain itu, dalam mendesain primer untuk PCR diperlukan beberapa data sekuens sebelumnya. Oleh karena itu, PCR hanya dapat digunakan untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya patogen atau gen yang diketahui. Batasan lain adalah bahwa primer yang digunakan untuk PCR dapat menempel secara non spesifik ke urutan yang serupa, tetapi tidak sepenuhnya identik dengan DNA target. Selain itu, nukleotida yang salah dapat dimasukkan ke dalam urutan PCR oleh DNA polimerase, meskipun dengan kecepatan yang sangat rendah (Garibyan dan Avashia, 2013).

### **II.5.3 Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis**

Ada dua metode utama yang digunakan untuk memvisualisasikan produk PCR: (1) pewarnaan produk DNA yang diperkuat dengan pewarna kimia seperti etidium bromida, yang menginterkalasi antara dua untai dupleks atau (2) memberi label pada primer PCR atau nukleotida dengan pewarna fluoresen (fluorofor) sebelum amplifikasi PCR. Metode terakhir memungkinkan label untuk langsung dimasukkan ke dalam produk PCR. Metode yang paling banyak digunakan untuk menganalisis produk PCR adalah penggunaan elektroforesis gel agarosa, yang memisahkan produk DNA berdasarkan ukuran dan muatan. Elektroforesis gel agarose adalah metode termudah untuk memvisualisasikan dan menganalisis

produk PCR. Ini memungkinkan untuk penentuan keberadaan dan ukuran produk PCR. Satu set produk DNA yang telah ditentukan sebelumnya dengan ukuran yang diketahui dijalankan secara bersamaan pada gel sebagai penanda molekuler standar untuk membantu menentukan ukuran produk (Garibyan dan Avashia, 2013).

#### **II.5.4 Sekuensing DNA**

Sekuensing DNA atau pengurutan basa DNA merupakan teknik kunci dalam perkembangan ilmu pengetahuan, di antaranya genetika, bioteknologi, biologi molekuler, dan genomika. Sekuensing DNA bertujuan untuk menentukan urutan basa nitrogen (adenin, guanin, sitosin, dan timin) suatu sampel DNA (França, Carrilho dan Kist, 2002).

#### **II.5.5 Analisis Sekuens DNA**

Setelah genom bakteri diurutkan, hal berikutnya adalah membuat anotasi. Anotasi adalah suatu proses di mana informasi struktural, fungsional, dan informasi biologis lainnya disimpulkan dari gen atau protein, dan ini didasarkan pada kemiripan dengan urutan yang dikarakterisasi sebelumnya dalam data base publik dan memerlukan analisis bioinformatika. Alat bioinformatika seperti BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang dapat diakses melalui (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>) telah ditemukan sangat berguna. Langkah pertama dalam proses anotasi adalah identifikasi urutan pengkodean protein yang diprediksikan, yang umumnya disebut kerangka baca terbuka. Tidak seperti genom eukariotik, identifikasi kerangka pembacaan terbuka pada genom bakteri dan prokariotik lainnya sangat akurat dan juga lebih mudah karena tidak adanya intron dan juga kepadatan gen yang tinggi yang dimiliki oleh organisme ini. Hanya sebagian dari semua kerangka pembacaan terbuka dalam urutan genom yang benar-benar mengkodekan protein, dan prediksi fungsinya dengan perbandingan basis

data dengan gen serupa dari fungsi yang diketahui merupakan tahap selanjutnya dalam proses anotasi (Donkor, 2013).

Kemiripan antar spesies bakteri yang didapatkan dinilai cukup tinggi apabila mencapai persentase kemiripan  $\geq 97\%$  dan dapat dikatakan satu spesies, sedangkan jika persentase kemiripan yang didapatkan  $< 97\%$  dinilai satu cakupan dalam tingkatan genus (Winand *et al.*, 2020). Skor yang lebih buruk karena kualitas urutan yang buruk dianggap sebagai hasil yang tidak dapat diinterpretasikan (Frickmann *et al.*, 2015).