

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



**AINUN AMINI
H041201037**



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

2024

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

AINUN AMINI
H041 20 1037



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

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

AINUN AMINI
H041 20 1037

Skripsi

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
BETINA *Anas domesticus* DI DUSUN TAMBUA DESA BONTO
MARANNU KECAMATAN LAU KABUPATEN MAROS

AINUN AMINI
H041 20 1037

Skripsi,

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Biologi pada 22 Juli 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

Pembimbing Pertama

Dr. Eddyman W. Ferial, M.Si.
NIP. 197001101997021001

Mengetahui
Ketua Program Studi

Dr. Magdalena Litany, 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 Betina *Anas domesticus* di 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 dan Dr. Eddyman W. Ferial, M. Si. sebagai Pembimbing Pertama). 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, 10 Juni 2024



UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan berkah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dan menyusun skripsi yang berjudul **Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Probiotik Asal Usus Itik Betina *Anas domesticus* di Dusun Tambua Desa Bonto Marannu Kecamatan Lau Kabupaten Maros**. Shalawat dan salam penulis haturkan kepada Rasulullah Muhammad SAW yang menjadi suri tauladan kita 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 penyelesaian skripsi ini merupakan suatu rangkaian perjuangan yang cukup panjang bagi penulis. Berbagai hambatan penulis alami dalam penyusunan skripsi ini. Berkat bantuan, dukungan, dan bimbingan dari berbagai pihak sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada keluarga besar terkhusus kepada kedua orang tua, Ayahanda Syahrul Syahrudin dan Ibunda Norma L. Yusi, saudari Penulis, Nurul Febriani Putri, Yuni Rahmananda, dan Ilmi Anugriani serta keponakan Penulis Maiza Nazneen Ufairah. Terima kasih atas dukungan yang telah diberikan kepada penulis baik moril maupun materil serta lantunan doa yang selalu dicurahkan kepada penulis. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kesehatan, keberkahan, nikmat iman, serta karunia di dunia maupun akhirat.

Penulis menyampaikan penghargaan setinggi-tingginya dan banyak terima kasih kepada Ibu Prof. Dr. Dirayah Rauf Husain, DEA. selaku pembimbing utama dan Bapak Dr. Eddyman W. Ferial, M.Si. selaku pembimbing pertama atas kesediannya yang telah meluangkan banyak waktu, tenaga dan pikiran dalam memberikan bimbingan dan motivasi kepada Penulis, mulai dari awal penyusunan sampai penyelesaian skripsi ini. Pada kesempatan ini pula, dengan segala kerendahan hati Penulis ingin 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 Prof. Dr. Fahrudin, M.Si. selaku Penasehat Akademik (PA) yang senantiasa memberikan arahan, dukungan dan bimbingan dari awal masa studi

hingga penyusunan skripsi ini dan Ibu Dr. Elis Tambaru, M.Si. selaku dosen penguji, terima kasih atas segala arahan dan saran 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 perkuliahan maupun pada saat penelitian dan penyelesaian skripsi ini.
6. Seluruh Staff Program Studi Biologi dan Staff Akademik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam untuk segala bantuan dalam hal administrasi.
7. Kak Fuad Gani S.Si. selaku Laboran Mikrobiologi dan kak Shamad S.Si, terima kasih atas bimbingan, saran dan ilmunya selama proses perkuliahan, penelitian, hingga penyusunan skripsi ini
8. Hayatul Azizah, Riska, Dhea Sagita, dan Yosheline selaku partner penelitian, yang selalu menemani dan memotivasi mulai dari awal penelitian hingga selesai.
9. Sahabat-sahabat Penulis, terima kasih atas dukungan, bantuan, do'a dan kebersamaannya selama proses perkuliahan, penelitian hingga penyusunan skripsi ini, terkhusus kepada Hasnawati dan Nahdhia Alfiah.
10. Teman-teman seperjuangan Biologi Angkatan 2020, terima kasih atas do'a, dukungan, bantuan, dan kebersamaannya selama perkuliahan, terkhusus kepada Sarwan, Doni, Ahmad Nurfakhry Salim, Muhammad Rizal Udin, Andi Alfhito dan Dzulfaida Rajasa yang telah banyak membantu selama penelitian dan penyusunan skripsi.
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. Akhir kata, penulis memohon maaf atas kesalahan yang tidak disengaja dalam rangkaian penyusunan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca.

Makassar, 10 Juni 2024

Ainun Amini

ABSTRAK

AINUN AMINI. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Probiotik Asal Usus Itik Betina *Anas domesticus* di Dusun Tambua Desa Bonto Marannu Kecamatan Lau Kabupaten Maros (dibimbing oleh Dirayah Rauf Husain dan Eddyman W. Ferial).

Peternakan itik merupakan salah satu industri peternakan yang maju di Indonesia yang memiliki potensi besar sebagai penghasil telur dan daging. Permasalahan yang dihadapi dalam peternakan itik salah satunya adalah tingkat pertumbuhan yang belum stabil sehingga peternak umumnya menggunakan suplemen tambahan yaitu AGP (*Antibiotic Growth Promotor*) yang dapat menimbulkan dampak negatif bagi ternak dan manusia bila digunakan secara terus-menerus. Adapun alternatif yang dapat menggantikan penambahan antibiotik yaitu dengan menggunakan bahan alami seperti bakteri probiotik yang dapat diperoleh dari saluran pencernaan unggas, seperti itik. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri probiotik dan mengetahui karakteristik isolat bakteri probiotik asal usus itik betina *Anas domesticus* di dusun Tambua, Desa Bonto Marannu, Kecamatan Lau, Kabupaten Maros. Isolasi bakteri probiotik dilakukan dengan menggunakan medium MRSA yang ditambahkan CaCO_3 1%. Kemampuan isolat sebagai bakteri probiotik diperoleh dengan melakukan uji ketahanan terhadap pH rendah, garam empedu dan suhu. Karakteristik bakteri dilakukan melalui uji makroskopik dengan mengamati bentuk koloni, uji mikroskopik dilakukan dengan pewarnaan Gram dan uji-uji biokimia seperti uji motilitas, uji MR-VP, uji katalase dan uji TSIA, serta uji daya hambat terhadap bakteri patogen dengan menggunakan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil yang diperoleh terdapat lima isolat BAL bersifat gram positif, berbentuk batang dan bulat, mampu tumbuh pada medium yang memiliki pH 2,5, medium yang mengandung garam empedu sintetik 1% dan 5%, suhu pertumbuhan 15 °C dan 45 °C, serta optimum pada suhu 37 °C. Kelima isolat bersifat non motil, positif terhadap uji MR, negatif terhadap uji VP, bersifat katalase negatif, dan mampu memfermentasi karbohidrat pada medium TSIA. Dari hasil uji daya hambat didapatkan bahwa ketiga isolat yaitu PiBM 3, PiBM 4 dan PiBM 5 memiliki kemampuan menghasilkan antimikroba yang bersifat bakterisida terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *S. aureus*.

Kata kunci: Itik Betina *Anas domesticus*, Bakteri probiotik, Usus itik.

ABSTRACT

AINUN AMINI. **Isolation and Characterization of Probiotic Bacteria from the Intestine of Female Ducks *Anas domestica* in Tambua Hamlet, Bonto Marannu Village, Lau Subdistrict, Maros Regency** (supervised by Dirayah Rauf Husain and Eddyman W. Ferial).

Duck farming is one of the advanced livestock industries in Indonesia that has great potential as a producer of eggs and meat. One of the problems faced in duck farming is the unstable growth rate so that farmers generally use additional supplements, namely AGP (Antibiotic Growth Promoter) which can have a negative impact on livestock and humans when used continuously. The alternative that can replace the addition of antibiotics is to use natural ingredients such as probiotic bacteria that can be obtained from the digestive tract of poultry, such as ducks. This study aims to obtain probiotic bacteria isolates and determine the characteristics of probiotic bacteria isolates from the intestines of female *Anas domestica* ducks in Tambua hamlet, Bonto Marannu Village, Lau District, Maros Regency. Isolation of probiotic bacteria was carried out using MRSA medium added with 1% CaCO₃. The ability of isolates as probiotic bacteria was obtained by conducting resistance tests to low pH, bile salts and temperature. Characterization of bacteria was done through macroscopic test by observing the shape of colonies, microscopic test was done by Gram staining and biochemical tests such as motility test, MR-VP test, catalase test and TSIA test, as well as inhibition test against pathogenic bacteria using *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria. The results obtained were five LAB isolates that were gram-positive, rod-shaped and round, able to grow on a medium that had a pH of 2.5, medium containing 1% and 5% synthetic bile salts, growth temperatures of 15 °C and 45 °C, and optimum at 37 °C. The five isolates are non-motile, positive for MR test, positive for VP test, catalase negative, and able to ferment carbohydrates on TSIA medium. From the results of the inhibition test, it was found that the three isolates, namely PiBM 3, PiBM 4 and PiBM 5, had the ability to produce antimicrobials that were bactericidal against the growth of *E.coli* and *S. aureus* bacteria.

Keywords: Female duck *Anas domestica*, Probiotic bacteria, Duck intestine.

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	2
1.2.1 Probiotik	2
1.2.2 Peranan probiotik	3
1.2.3 Karakteristik probiotik	4
1.2.4 Jenis bakteri probiotik	6
1.2.5 Mekanisme kerja probiotik	6
1.2.6 Itik <i>Anas domesticus</i>	8
1.2.7 Anatomi sistem pencernaan itik	9
1.3 Tujuan	9
1.4 Manfaat	10
BAB II METODE PENELITIAN	11
2.1 Tempat dan Waktu	11
2.2 Alat dan Bahan	11
2.2.1 Alat	11
2.2.1 Bahan	11
2.3 Metode Kerja	11
2.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan	11
2.3.2 Pembuatan Media	11

2.3.3 Pengambilan Sampel Itik Betina.....	12
2.3.4 Isolasi Bakteri Probiotik	13
2.3.5 Pemurnian Bakteri Probiotik	13
2.3.6 Pengamatan Morfologi Bakteri Probiotik	13
2.3.7 Uji Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik	14
2.3.8 Uji Karakterisasi Biokimia.....	14
2.3.9 Uji Daya Hambat terhadap Bakteri Patogen.....	15
2.4 Analisis Data.....	16
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN	17
3.1 Pengambilan Sampel.....	17
3.2 Isolasi Bakteri Asam Laktat.....	17
3.3 Pemurnian Bakteri Asam Laktat.....	19
3.4 Pengamatan Morfologi Bakteri Asam Laktat	19
3.4.1 Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Asam Laktat.....	19
3.4.2 Pengamatan Morfologi Sel Bakteri Asam Laktat	20
3.5 Uji Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik.....	22
3.5.1 Uji Ketahanan terhadap Keasaman Lambung (pH)	22
3.5.2 Uji Ketahanan terhadap Garam Empedu.....	23
3.5.3 Uji Ketahanan terhadap Suhu.....	25
3.6 Uji Karakterisasi Biokimia.....	26
3.7 Uji Daya Hambat terhadap Bakteri Patogen	29
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	33
4.1 Kesimpulan	33
4.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA.....	34

DAFTAR TABEL

Nomor Urut	Halaman
1. Hasil pengamatan morfologi koloni.....	20
2. Hasil pengamatan pewarnaan Gram.....	21
3. Hasil pengamatan uji ketahanan terhadap keasaman lambung (pH).....	22
4. Pertumbuhan BAL pada uji ketahanan terhadap garam empedu 1% dan 5%..	24
5. Pertumbuhan BAL pada suhu 15 °C, 37 °C dan 45 °C.....	25
6. Hasil uji karakterisasi biokimia.....	26
7. Uji daya hambat isolat BAL terhadap bakteri patogen.....	29

DAFTAR GAMBAR

Nomor Urut	Halaman
1. Mekanisme kerja probiotik.....	7
2. Itik <i>Anas domesticus</i>	8
3. Sistem pencernaan itik.....	9
4. Lokasi pengambilan sampel.....	17
5. Hasil isolasi BAL dari usus halus itik betina.....	18
6. Hasil pemurnian isolat BAL.....	19
7. Hasil pengamatan morfologi koloni.....	20
8. Hasil pengamatan pewarnaan Gram.....	21
9. Pertumbuhan BAL pada pH 2,5.....	22
10. Pertumbuhan BAL pada uji ketahanan garam empedu 1% dan 5%.....	24
11. Pertumbuhan BAL pada suhu 15 °C, 37 °C dan 45 °C.....	25
12. Hasil uji MR isolat BAL.....	27
13. Hasil uji VP isolat BAL.....	27
14. Hasil uji TSIA isolat BAL.....	28
15. Hasil uji motilitas isolat BAL.....	28
16. Hasil uji katalase isolat BAL.....	29
17. Hasil uji daya hambat isolat BAL terhadap bakteri patogen.....	30

DAFTAR LAMPIRAN

Tabel	Halaman
1. Alur penelitian.....	40
2. Alur Kerja Isolasi Bakteri Probiotik Itik Betina <i>Anas domesticus</i>	41
3. Lokasi Pengambilan Sampel	42
4. Preparasi Sampel Usus Itik Betina	42
5. Hasil Pemurnian BAL dari Usus Itik Betina Maros.....	43
6. Stok BAL asal Usus Itik Betina Maros	44
7. Pengamatan Morfologi BAL asal Usus Itik Betina Maros	45
8. Pengamatan Morfologi Sel BAL asal Usus Itik Betina Maros	46
9. Uji Daya Hambat Isolat BAL asal Usus Itik Betina Maros.....	47

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Peternakan itik merupakan salah satu industri peternakan yang maju di Indonesia yang memiliki potensi besar sebagai penghasil telur dan daging. Permasalahan yang dihadapi dalam peternakan itik salah satunya adalah tingkat pertumbuhan yang belum stabil sehingga peternak umumnya menggunakan suplemen tambahan yaitu antibiotik pada pakan ternak (Sukma *et al.*, 2023). Penggunaan antibiotik secara terus-menerus dalam pakan ternak menimbulkan dampak negatif seperti ketidakseimbangan mikroflora normal dan berkurangnya mikroflora usus yang bermanfaat, akumulasi residu antibiotik dalam produk (daging dan telur) serta resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik yang dapat meningkatkan risiko penularan bakteri patogen dari unggas ke manusia. Kehadiran antibiotik dalam makanan manusia dikaitkan dengan beberapa efek buruk terhadap kesehatan masyarakat termasuk hipersensitivitas, kerusakan jaringan, gangguan pencernaan dan gangguan neurologis. Adapun alternatif yang dapat menggantikan penambahan antibiotik yaitu dengan menggunakan bahan alami seperti probiotik (Suswoyo *et al.*, 2021).

Probiotik merupakan suplemen tambahan pakan berupa mikroorganisme yang dapat hidup berdampingan dengan mikroflora usus. Pemberian probiotik pada pakan ternak dapat meningkatkan pertumbuhan dan efisiensi pakan dengan cara menyeimbangkan populasi mikroba dalam saluran pencernaan dan mengendalikan mikroorganisme patogen dalam tubuh ternak. Keseimbangan mikroorganisme usus tercapai ketika mikroba menguntungkan mampu menghambat mikroba merugikan, dan mikroba patogen didorong keluar dari ekosistem saluran pencernaan oleh mikroba menguntungkan atau normal. Selain itu, probiotik juga dapat meningkatkan gerakan peristaltik usus, mendetoksifikasi dan menghilangkan bahan makanan berbahaya serta menyediakan enzim yang membantu mencerna beberapa makanan (Ray, 1996). Tidak semua bakteri dapat dijadikan sebagai probiotik, kecuali bakteri yang dapat memenuhi kriteria tertentu. Bakteri yang memenuhi syarat sebagai probiotik antara lain tidak bersifat patogen, aman dikonsumsi, mampu bertahan dan stabil dalam penyimpanan serta mampu bertahan di saluran pencernaan setelah melewati lambung atau Probiotik harus tahan asam dan garam empedu (Zurmiati *et al.*, 2014).

Golongan bakteri yang dapat digunakan sebagai bakteri probiotik adalah Bakteri Asam Laktat (BAL). Penggunaan BAL sebagai probiotik pada ternak unggas idealnya juga berasal dari unggas, hal ini disebabkan kemampuan adaptasi pada lingkungannya lebih mudah, sehingga cepat diperoleh keseimbangan mikroflora usus pada unggas tersebut. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Risna *et al.* (2021) dan Khairunnisa *et al.* (2022) membuktikan bahwa BAL dapat diperoleh dari usus unggas, salah satunya itik. Jika dibandingkan dengan ternak kelas unggas lainnya, itik mempunyai tingkat adaptasi dan imunitas lebih tinggi (Hermawan *et al.*, 2023).

Itik (*Anas domesticus*) memiliki daya adaptasi tinggi dipengaruhi oleh banyak faktor, salah satunya yaitu lingkungan dan sistem pemeliharaan. Di desa Bonto Marranu Kabupaten Maros, sebagian besar wilayahnya merupakan lahan tambak dan pertanian. Selain itu, sebagian masyarakatnya juga berternak unggas seperti itik, tetapi dalam skala kecil yang sistem pemeliharaannya semi intensif (dikandangan di malam hari dan diumbar/digembalakan di siang hari). Sistem pemeliharaan semi intensif mengakibatkan timbulnya variasi konsumsi pakan dan *nutrient intake* yang diperoleh oleh itik, karena itik diberikan kesempatan bebas untuk mencari pakan sehingga dapat mempengaruhi mikroflora usus (Rahayu *et al.*, 2019). Mikroflora tersebut beradaptasi dengan lingkungannya sehingga membentuk komunitas bakteri yang tahan terhadap lingkungan hidup itik (Syafitri *et al.*, 2016; Husain *et al.*, 2017). Berdasarkan uraian tersebut, maka dilakukanlah penelitian untuk memperoleh isolat bakteri dan mengetahui karakteristik bakteri probiotik asal usus itik betina *Anas domesticus* di Dusun Tambua, Desa Bonto Marannu, Kecamatan Lau, Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan.

1.2 Teori

1.2.1 Probiotik

Istilah probiotik pertama kali diperkenalkan oleh Lilley dan Stillwell pada tahun 1965 yang mendefinisikan probiotik sebagai mikroba yang menstimulasi pertumbuhan mikroba lainnya. Probiotik berasal dari bahasa Yunani yang artinya “untuk hidup” (*Pro* = untuk dan *biotic* = hidup). Selanjutnya digunakan oleh Parker untuk menjelaskan organisme atau substansi yang memiliki kontribusi terhadap keseimbangan mikroflora usus. Menurut Fuller, Probiotik adalah bakteri hidup yang bila dikonsumsi oleh inangnya akan memberikan manfaat dengan menyeimbangkan lingkungan mikrobiota dalam sistem pencernaan (Sunaryanto *et al.*, 2014).

Konsep probiotik dikembangkan dari sebuah teori autointoksikasi yang dikemukakan oleh seorang ilmuwan Rusia penerima Nobel Biologi tahun 1908 yaitu Elie Metchnikoff. Menurutnya, secara perlahan pembusukan (putrefeksi) oleh bakteri dalam usus besar menghasilkan senyawa-senyawa beracun yang memasuki peredaran darah, yang disebut sebagai proses autointoksikasi. Proses inilah yang menyebabkan penuaan dan beberapa penyakit-penyakit degeneratif. Dia meyakini bahwa tingginya usia hidup warga suku-suku pegunungan di Bulgaria merupakan hasil dari konsumsi produk susu fermentasi. Bakteri yang ikut terkonsumsi bersama produk tersebut dan kemudian mampu tinggal di usus berpengaruh positif terhadap mikroflora di kolon dengan cara menurunkan efek toksik dari mikroorganisme yang merugikan di kolon (Yuniastuti, 2015).

Menurut *Food and Agriculture Organization* (FAO) dan *World Health Organization* (WHO) (2001), probiotik merupakan mikroorganisme yang terdapat dalam jumlah yang cukup di dalam tubuh inangnya untuk membantu kesehatan inangnya. Misalnya, proses probiotik memengaruhi mikrobiota usus atau meningkatkan respons imun. Pada rumen ternak ruminansia, ditemukan berbagai

macam mikroorganisme yang membantu proses pencernaan sehingga ternak secara alamiah telah memanfaatkan bantuan mikroba dalam pencernaannya atau dapat dikatakan telah menggunakan probiotik. Sama halnya dengan ternak non-ruminansia seperti unggas, bagian ususnya juga ditemukan berbagai mikroba, baik yang menguntungkan maupun yang merugikan atau patogen. Mikroba yang menguntungkan secara alami ada dalam usus dapat diisolasi dan diperbanyak untuk diintroduksi kembali ke sistem pencernaan serta dipakai sebagai probiotik. Namun, mikroorganisme yang dipakai sebagai probiotik harus dapat aktif dalam berbagai kondisi lingkungan yang berbeda dan tetap hidup dalam berbagai bentuk (Kompang, 2009).

Probiotik merupakan bakteri yang menguntungkan bagi inangnya, yang terdapat pada saluran usus. Menurut Dordevic et al. (2006), probiotik dapat meningkatkan sekresi sitokin anti-inflamasi dan secara kompetitif menghalangi adhesi patogen di permukaan mukosa usus sehingga pertumbuhan bakteri patogen dapat dicegah. Selain itu, bakteri probiotik memiliki kapasitas untuk menjaga keseimbangan mikroflora di usus (Rusilanti, 2006). Probiotik merupakan produk masa depan yang digunakan sebagai alternatif pengganti antibiotik sebagai *growth promotor*. Mikroorganisme yang banyak digunakan sebagai probiotik yaitu *strain Lactobacillus*, *Bacillus sp.*, dan *Saccharomyces cereviceae* (Priastoto et al., 2016).

1.2.2 Peranan Probiotik

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang jika diberikan dalam jumlah yang cukup dapat memberikan manfaat kesehatan bagi inang seperti meringankan infeksi saluran cerna, menstimulasi sistem kekebalan tubuh, menurunkan kadar kolesterol, mencegah dan mengobati alergi, efek antimutagenik, serta menstabilkan *barrier* (pertahanan) mukosa usus. *Strain Lactobacillus* adalah salah satu probiotik yang paling umum digunakan dalam makanan fungsional, termasuk *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (Abdelshafy et al., 2022). Berdasarkan penelitian sebelumnya mengenai pengaruh langsung probiotik terhadap mikroflora usus diketahui bahwa *Bacillus subtilis* CU1 dan *B. subtilis* DSM32315 dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh pada lansia dan *barrier* (pertahanan) usus pada babi (Levefre et al., 2015 ; Tang et al., 2019). *Lactobacillus casei Shirota* dapat mengaktifkan aferen vagal untuk mengatur otak dan mengurangi stres (Takada et al., 2016).

Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang mengatur keseimbangan bakteri dalam usus dan memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan hewan berdarah panas. Probiotik berperan penting dalam pengobatan penyakit sistem pencernaan, termasuk sindrom iritasi usus besar, diare menular, penyakit radang usus, penyakit hati berlemak non-alkohol (NAFLD), kanker kolorektal, dan disfungsi pencernaan. Probiotik mengatur keseimbangan mikflora intestinal, sistem kekebalan tubuh dan pusat saraf usus terutama melalui molekul efektor. Molekul efektor terdiri atas bakteriosin, peptidoglikan (PG), asam teikoat (TA), eksopolisakarida (EPS), protein sekretori dan asam lemak rantai pendek (SCFA) (Gao et al., 2022). Tiga mekanisme utama yang digunakan bakteriosin untuk

memodulasi kesehatan inang yaitu dengan melindungi bakteri menguntungkan di dalam usus, secara kompetitif menghambat bakteri patogen dan mempengaruhi sistem kekebalan tubuh inang (Umu *et al.*, 2017).

Penggunaan antibiotik yang lebih luas sebagai *feed additive* dalam jangka panjang dapat berkontribusi pada perkembangan bakteri yang resisten terhadap obat-obatan yang digunakan untuk mengobati infeksi dan berpotensi menimbulkan risiko menular ke manusia sehingga pada tahun 2009, lembaga pemerintah di Amerika Serikat seperti *Food and Drug Administration* (FDA) menyatakan bahwa penggunaan antibiotik untuk pemacu pertumbuhan harus dihilangkan (FDA, 2009). Oleh karena itu, penggunaan antibiotik telah diminimalkan dan digantikan oleh suplemen makanan yang efektif seperti probiotik atau prebiotik yang diklaim dapat meningkatkan pertumbuhan dan secara positif memodulasi respons kekebalan tubuh. Ada banyak studi yang melaporkan pengaruh penggunaan probiotik termasuk *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, dan ragi seperti *Saccharomyces cerevisiae* terhadap berbagai parameter performa pada unggas, termasuk respon kekebalan tubuh dan efisiensi pakan pada unggas. Pakan ayam pedaging yang disuplementasi *Bacillus coagulans* secara signifikan meningkatkan penambahan berat badan akhir dan harian, rasio konversi pakan dan tingkat kelangsungan hidup, jika dibandingkan dengan ayam pedaging yang tidak disuplementasi, sehingga probiotik direkomendasikan untuk menggantikan antibiotik sebagai pemacu pertumbuhan pada produksi ayam pedaging (Khalaifah, 2018). Tellez *et al.* (2012) melaporkan bahwa probiotik *Lactobacillus* secara signifikan mengurangi *Salmonella* spp. ketika diberikan dalam jumlah tinggi pada produksi ayam pedaging.

Salah satu peran bakteri probiotik adalah sebagai kontrol kadar kolesterol dan trigliserida. Hasil penelitian yang dilakukan Yansen (2021) menyatakan bahwa *Weisella paramesenteroides* berhasil menurunkan kadar trigliserida pada daging itik Bayang secara optimum pada pemberian 2 ml ($2,54 \times 10^7$ CFU/g) probiotik. Penurunan kadar trigliserida pada daging itik Bayang disebabkan oleh dihasilkannya enzim lipase oleh probiotik *W. paramesenteroides*, dimana enzim ini mampu mencerna trigliserida. Probiotik menghasilkan asam laktat yang dapat menurunkan pH sehingga dapat menghalangi pertumbuhan bakteri patogen dan menghasilkan bakteriosin. Bakteriosin memberikan efek antagonis terhadap pertumbuhan bakteri patogen sehingga menurunkan pertumbuhan bakteri dan menyeimbangkan mikroflora dalam usus (Philip, 1993).

1.2.3 Karakteristik Probiotik

Antibiotic Growth Promotor (AGP), seperti antibiotik ionofor, telah digunakan secara luas dan masih digunakan di beberapa negara. Namun, karena meningkatnya kekhawatiran akan risiko pengembangan resistensi antibiotik dan persistensi residu kimiawi pada produk hewan, beberapa strategi yang didasarkan pada suplementasi produk yang lebih "alami" seperti probiotik, telah dikembangkan untuk meningkatkan kesehatan dan produktivitas ternak. Beberapa kriteria yang diperlukan agar mikroorganisme dapat dianggap sebagai probiotik: mikroorganisme

tersebut harus tidak berbahaya, tidak menyebabkan toksisitas atau penyakit pada inang, mikroorganisme tersebut harus ada dalam jumlah yang tinggi dalam produk yang diberikan dan mempertahankan kelangsungan hidupnya selama masa simpan produk, dan mikroorganisme tersebut harus dapat digunakan secara efisien dan dapat bertahan hidup di saluran cerna (Hu *et al.*, 2018).

Mikroorganisme probiotik harus mampu bertahan hidup di bawah faktor stres gastrointestinal untuk mempertahankan fungsi biologisnya di dalam inang (Mbye *et al.*, 2020). Kemampuan strain probiotik untuk bertindak sebagai probiotik juga ditentukan oleh kemampuan mereka untuk bertahan hidup dalam pH rendah lambung dan konsentrasi garam empedu yang tinggi di saluran pencernaan (Kobierecka *et al.*, 2017). Garam empedu yang dilepaskan di usus kecil merusak bakteri dengan menghancurkan membran sel bakteri. Namun, *Lactobacillus* memiliki enzim *bile salt hidrolase* (BSH), yang menghidrolisis garam empedu dan mengurangi kelarutannya (Jannah *et al.*, 2014).

Bakteri probiotik yang hidup di lambung harus tahan terhadap pH 3-4 (asam), yang merupakan pH lapisan lendir lambung dan konsentrasi garam empedu minimal 0,3%. Ketahanan hidup pada pH rendah (asam) terkait dengan kemampuan bakteri untuk mengimbangi kondisi internal sel dengan kondisi luar. Adanya pelindung alami dalam produk yang dikonsumsi seperti protein dan lemak dapat meningkatkan ketahanan asam. Kemampuan untuk dapat bertahan hidup pada kondisi garam empedu konsentrasi tinggi merupakan syarat suatu isolat bakteri mampu membentuk koloni dan melakukan aktivitas metabolisme pada inangnya (Priadi *et al.*, 2020).

Aktivitas antagonis mikroorganisme probiotik terhadap patogen merupakan karakteristik probiotik yang menjaga keseimbangan mikroflora usus dan menjaga usus terbebas dari patogen. Probiotik menghambat pertumbuhan bakteri patogen melalui produksi senyawa antimikroba nonspesifik seperti asam lemak rantai pendek, hidrogen peroksida, dan protein dengan berat molekul rendah. Beberapa strain bakteri *Lactobacillus* diketahui dapat menghambat pertumbuhan bakteri termasuk *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *C. perfringens*, *Klebsiella* spp, dan *Proteus* spp. yaitu dengan cara berikatan dengan reseptor spesifik dan menyebabkan kerusakan sel (Tsega *et al.*, 2023).

Kandidat bakteri probiotik harus memiliki karakteristik yaitu tidak berbahaya bagi inang dan tes yang digunakan untuk menilai keamanan probiotik adalah tes aktivitas hemolitik. Karakteristik lainnya adalah terkait hidrofobisitas bakteri probiotik, bakteri dengan hidrofobisitas tinggi akan mampu tinggal/melekat dipermukaan usus, berkembang biak dan dapat masuk kedalam jaringan. Pelekatan bakteri probiotik pada mukosa usus menunjukkan adanya interaksi hidrofobik yang melibatkan membran sel bakteri dan dinding permukaan sel inang serta dibantu dengan adanya penunjang adhesi seperti lektin. Salah satu yang mendukung pelekatan adalah produksi eksopolisakarida (EPS) oleh bakteri. Apabila bakteri probiotik tidak dapat melekat pada mukosa usus maka tidak terjadi kolonisasi bakteri sehingga hilang kemampuannya dalam melawan bakteri patogen dalam saluran pencernaan (Priadi *et al.*, 2020).

1.2.4 Jenis Bakteri Probiotik

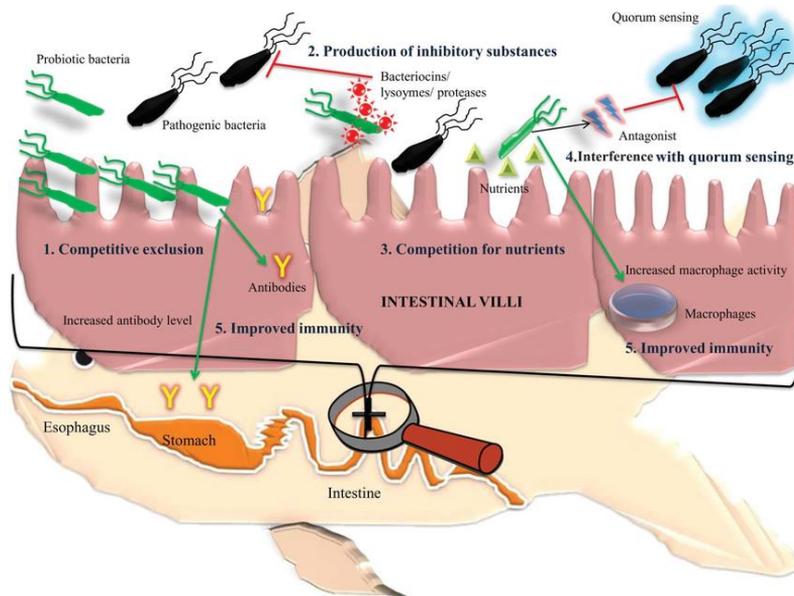
Probiotik merupakan kultur tunggal atau campuran dari mikroorganisme hidup yang memberikan manfaat kesehatan bagi inang ketika diberikan dalam jumlah yang cukup (Nour *et al.*, 2021). Sebagian besar probiotik berasal dari bakteri, terutama kelompok bakteri asam laktat (BAL) dan *Bifidobacterium*, yang biasanya digunakan secara komersial dan dianggap aman untuk dikonsumsi manusia dalam jangka panjang. Bakteri-bakteri ini termasuk *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, dan *Lactobacillus plantarum*. Selain itu, terdapat satu spesies ragi yang digunakan sebagai probiotik yaitu *Saccharomyces boulardii*. (Dewi *et al.*, 2021).

Bakteri asam laktat adalah kelompok besar mikroorganisme yang secara fisiologis menghasilkan asam laktat sebagai metabolit utama. Bakteri ini merupakan gram positif, tidak berspora, berbentuk basil atau kokus, dan fakultatif anaerob. Bakteri asam laktat secara alami dapat ditemukan pada bahan pangan fermentasi, di saluran gastrointestinal dan urogenital manusia serta hewan. Selama pertumbuhannya, bakteri asam laktat dapat menghasilkan berbagai metabolit, seperti asam organik, hidrogen peroksida, dan bakteriosin (Emmawati *et al.*, 2015).

1.2.5 Mekanisme Kerja Probiotik

Microbial ecology dari usus sangat penting, oleh karena *gut microenvironment* berpengaruh terhadap nutrisi, *feed conversion* dan terjadinya penyakit pada *host*. Ternak yang mengalami stress, sakit atau diberikan pakan dengan tambahan antibiotik secara terus menerus, dapat menyebabkan perubahan baik macam maupun jumlah dari mikroflora usus. Bakteri probiotik mempunyai banyak dan macam pengaruh yang menguntungkan pada kesehatan *host* baik secara langsung maupun tidak langsung termasuk: meningkatkan fungsi *barrier* (pertahanan) mukosa, perbaikan mikroflora normal, mencegah penyakit infeksi, mencegah alergi makanan, mereduksi kolesterol dalam darah, aktifitas anti kariogenik, memodulasi sistem imun mukosa, memproduksi bahan antimikroba, meningkatkan pencernaan dan absorpsi makanan serta merubah mikroflora usus. Efikasi dari probiotik tergantung pada aktifitas mekanisme kerjanya termasuk kemampuan untuk melekat (*adherence*) dan berkolonisasi pada *human gut* yang nantinya akan meningkatkan sistem imun dari *host*. Adanya perlekatan bakteri probiotik terhadap sel akan menimbulkan bermacam aktifitas biologis terutama pelepasan sitokin dan kemokin, selanjutnya akan menstimulasi aktifitas mukosa dan imunitas sistemik dari *host* (Kusumaningsih, 2014). Menurut Putra *et al.* (2022) yang mengutip dari Fuller (2001), bahwa mekanisme kerja probiotik adalah dengan melekat atau menempel dan berkolonisasi dalam saluran pencernaan. Untuk bisa menempel dan berkolonisasi maka harus diisolasi bakteri yang sudah beradaptasi dan penghuni asli di saluran usus *host*. Kemampuan probiotik untuk bertahan hidup dalam saluran pencernaan dan menempel pada sel-sel usus adalah sesuatu yang diinginkan. Hal ini dapat terjadi jika diisolasi bakteri indigenus. Jika mampu berkolonisasi maka tahap selanjutnya dapat digunakan untuk berperan dalam

sistem kekebalan hewan inang. Kekebalan terjadi karena proses metabolisme tubuh berjalan dengan baik karena penyerapan gizi yang optimum. Kemampuan menempel yang kuat pada sel-sel usus menyebabkan bakteri probiotik berkembang dengan baik. Mikroba tersebut akan menghalangi mikroba patogen menempel pada vili usus halus.



Gambar 1. Mekanisme kerja probiotik (Zorriezahra *et al.*, 2016)

Mikroba probiotik juga menghambat bakteri patogen dengan cara berkompetisi untuk mendapatkan sejumlah substrat bahan makanan untuk difermentasi. Substrat makanan tersebut diperlukan agar mikroba probiotik dapat berkembang dengan baik. Substrat bahan makanan yang mendukung perkembangan mikroba probiotik dalam saluran pencernaan disebut “prebiotik”. Prebiotik ini adalah terdiri dari bahan–bahan makanan yang pada umumnya banyak mengandung serat sehingga bakteri probiotik berkompetisi dengan cara menghasilkan zat-zat yang diperlukan untuk membantu proses pencernaan substrat tersebut dalam bentuk enzim. Enzim tersebut dapat dihasilkan oleh BAL yang menghasilkan enzim selulase. Enzim ini mampu memecah komponen serat kasar yang merupakan komponen yang sulit dicerna dalam saluran pencernaan ternak unggas. Efek pemecahan serat kasar yang dibantu enzim mengakibatkan pertumbuhan jaringan dan peningkatan pertambahan bobot badan (Zurmiati *et al.*, 2014). Probiotik dapat menstimulasi mukosa dan meningkatkan sistem kekebalan hewan inang dengan cara menghasilkan toksin yang dapat mereduksi dan menghambat perkembangan mikroba-mikroba patogen dalam saluran pencernaan. Mekanisme ini dapat meningkatkan kekebalan hewan inang. Toksin-toksin yang dihasilkan tersebut merupakan antimikroba yang mengakibatkan mikroba patogen berkurang di dalam saluran pencernaan. Hal ini akan memberikan

keuntungan terhadap kesehatan hewan inang sehingga tahan terhadap serangan penyakit. Selain itu, penggunaan probiotik pada ternak unggas dapat menurunkan aktivitas urease. Urease adalah suatu enzim yang bekerja menghidrolisis urea menjadi amonia sehingga pembentukan amonia berkurang. Amonia adalah suatu bahan yang dapat menyebabkan keracunan pada sistem pernafasan unggas (Putra *et al.*, 2022).

1.2.6 Itik *Anas domesticus*

Itik merupakan salah satu ternak unggas penghasil protein hewani yang produksinya adalah telur dan daging (Fatmona *et al.*, 2023). Ciri dan karakteristik itik secara umum yaitu memiliki tubuh langsing, berleher panjang, kaki lebih pendek dibandingkan tubuhnya, antara jari yang satu dengan yang lain dihubungkan dengan selaput renang, warna bulunya coklat muda, putih, dan hitam, bulunya tebal dan berminyak sehingga dapat menghalangi air masuk ke dalam tubuhnya ketika di dalam air (Budi, 2017).



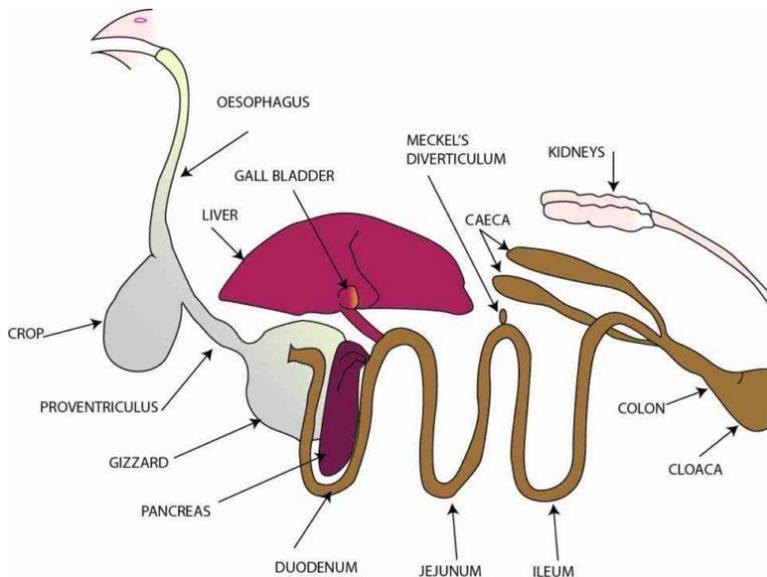
Gambar 2. Itik *Anas domesticus* (Sarandani, 2016)

Itik diklasifikasikan sebagai salah satu unggas. Adapun klasifikasi itik menurut Muliani (2014) yaitu:

Kingdom : Animalia
 Filum : Chordata
 Kelas : Aves
 Ordo : Anseriformes
 Famili : Anatidae
 Genus : *Anas*
 Spesies : *Anas domesticus* L.

Genus *Anas* adalah itik lokal Indonesia. Itik lokal Indonesia hampir seluruhnya merupakan keturunan bangsa itik *Indian Runner*, yaitu bangsa itik yang dikenal sebagai itik penghasil telur dan sudah beradaptasi baik dengan lingkungan Indonesia sejak berabad-abad lampau. Potensi itik *Indian Runner* sebagai sumber bahan pangan hewani cukup besar. Akibat domestikasi, terbentuklah beberapa varian seperti besar tubuh, konformasi, dan warna bulu, serta dikenal sebagai *Anas domesticus* (Muliani, 2014).

1.2.7 Anatomi Sistem Pencernaan Itik



Gambar 3. Sistem Pencernaan Itik (Sumber: Frank, 2021)

Organ pencernaan unggas terdiri dari mulut, esofagus, tembolok, proventrikulus, ampela, usus halus, usus buntu, usus besar, dan anus. Organ pelengkap yang juga tidak kalah penting adalah hati, empedu, pankreas dan limpa. Organ pencernaan terdiri atas saluran yang memanjang mulai dari mulut melanjut ke usus dan berakhir di lubang pelepasan atau anus. Proses pencernaan unggas terdiri dari pencernaan secara mekanik (fisik), kimiawi (enzimatis), dan mikrobiologis. Prinsip pencernaan pada unggas ada tiga macam, yaitu pencernaan secara mekanik (fisik) dilakukan oleh kontraksi otot polos, terutama terjadi di empedal (*gizzard*) yang dibantu oleh bebatuan (*grit*), pencernaan secara kimia (enzimatik) dilakukan oleh enzim pencernaan yang dihasilkan kelenjar saliva di mulut, enzim yang dihasilkan oleh proventrikulus, enzim dari pankreas, enzim empedu dari hati, dan enzim dari usus halus, dan pencernaan secara mikrobiologik (jumlahnya sedikit sekali) dan terjadi di sekum dan kolon. Secara umum pencernaan unggas meliputi aspek beberapa aspek, yaitu digesti yang terjadi pada paruh, tembolok, proventrikulus, ventrikulus (empedal/ guisar), usus halus, usus besar dan ceca, absorpsi yang terjadi pada usus halus (*small intestine*) melalui vili-vili (jonjot usus), metabolisme yang terjadi pada sel tubuh yang kemudian disintesis menjadi protein, glukosa dan hasil lain untuk pertumbuhan badan, produksi telur atau daging, pertumbuhan bulu, penimbunan lemak, dan menjaga atau memelihara tubuh dari proses kehidupannya (Sarandani, 2016).

1.3 Tujuan

1. Memperoleh isolat bakteri probiotik asal usus itik betina *Anas domestica* di Dusun Tambua, Desa Bonto Marannu, Kecamatan Lau, Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan

2. Mengetahui karakteristik bakteri probiotik asal usus itik betina *Anas domesticus* di Dusun Tambua, Desa Bonto Marannu, Kecamatan Lau, Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah mengenai karakteristik bakteri yang berpotensi sebagai probiotik dari usus itik betina *Anas domesticus* di Dusun Tambua Desa Bonto Marannu Kecamatan Lau Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan dalam pemanfaatannya untuk meningkatkan produktivitas ternak.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Pengambilan sampel itik betina *Anas domesticus* sebagai sumber bakteri probiotik diperoleh dari Dusun Tambua Desa Bonto Marannu Kecamatan Lau Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan. Adapun isolasi dan karakterisasi isolat bakteri probiotik dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari - Mei 2024.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

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

2.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah usus segar itik betina *Anas domesticus*, air suling, alkohol 70%, medium selektif MRSA (*de Man Rogosa Sharpe Agar*) (OXOID), medium selektif MRSB (*de Man Rogosa Sharpe Broth*) (OXOID), medium NA (*Nutrient Agar*) (MERCK), medium TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) (MERCK), medium SIM (*Sulfid Indol Motility*) (MERCK), medium MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*) (MERCK), KOH 40%, alfanafтол, *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, *paper disk*, *cling wrap* dan label.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

1. Alat-alat gelas berupa tabung reaksi, cawan petri, gelas objek dan pipet tetes disterilkan dengan sterilisasi panas kering (udara panas) pada oven. Sterilisasi dilakukan pada temperatur 170 - 180 °C selama 1-2 jam (Lay dan Hastowo, 1992).
2. Jarum ose disterilkan dengan sterilisasi panas kering dalam nyala api bunsen sampai merah membara (Dwyana dan Gobel, 2011)

2.3.2 Pembuatan Media

Pembuatan medium menurut Bridson (2006):

A. Medium MRSA (*de Mann Rogosa Sharpe Agar*)

Sebanyak 6,2 g medium MRSA dan CaCO₃ 1% dilarutkan ke dalam 100 mL air suling dan dibuat dalam pH 6,2. Kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai homogen. Selanjutnya larutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan mulut erlenmeyer ditutup dengan menggunakan *aluminium foil*, lalu disterilkan dalam otoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

B. Medium MRSB (*de Man Ragosa Sharpe Broth*)

Sebanyak 5,2 g medium MRSB dilarutkan ke dalam 100 mL air suling dan dibuat dalam pH 6,2. Kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai homogen. Selanjutnya larutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan mulut erlenmeyer ditutup dengan menggunakan aluminium foil, lalu disterilkan dalam otoklaf dengan suhu 121 °C 2 atm selama 15 menit.

C. Medium NA (*Nutrient Agar*)

Sebanyak 2 g medium NA dilarutkan ke dalam 100 ml air suling dibuat dalam pH 7. Kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai homogen. Selanjutnya larutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan mulut erlenmeyer ditutup dengan menggunakan aluminium foil, lalu disterilkan dengan otoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

D. Medium TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Sebanyak 6,5 g medium TSIA dilarutkan ke dalam 100 mL air suling dibuat dalam pH 7,4. Kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai homogen. Selanjutnya medium dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi masing-masing sebanyak 7 ml. Kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

E. Medium SIM (*Sulfid Indol Motility*)

Sebanyak 3 g medium SIM dilarutkan ke dalam 100 ml air suling dibuat dalam pH 7,3. Kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai homogen. Selanjutnya medium dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi masing-masing sebanyak 7 mL. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

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

Sebanyak 1,7 g medium MR-VP dilarutkan ke dalam 100 mL air suling dibuat dalam pH 6,9. Kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai homogen. Selanjutnya medium dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.3 Pengambilan Sampel Itik Betina

Sampel itik betina *Anas domestica* sehat dan tidak dalam keadaan stress diambil dari Dusun Tambua Desa Bonto Marannu Kecamatan Lau Kabupaten Maros. Sampel lalu disembelih, dicabut bulunya, kemudian 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 plastik sampel dan cool box. Selanjutnya sampel usus itik betina kemudian dibawa ke laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin untuk dilakukan proses isolasi dan karakterisasi.

2.3.4 Isolasi Bakteri Probiotik

Sampel usus itik betina terlebih dahulu dipotong membujur menjadi dua bagian, kemudian dinding bagian dalam dikerok menggunakan skalpel. Bagian yang telah dikerok dimasukkan 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 sebar (*spread plate*). Dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 2x24 jam. Pertumbuhan bakteri asam laktat ditandai dengan zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri.

2.3.5 Pemurnian Bakteri Probiotik

Pemurnian dimulai dengan memilih koloni-koloni yang disekitarnya terbentuk zona bening. Selanjutnya mensterilkan jarum ose, lalu koloni bakteri diinokulasikan pada permukaan medium MRSA yang mengandung CaCO_3 1% dengan metode *quadran streak* untuk mendapatkan koloni yang terpisah. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2x24 jam. Tahap pemurnian dapat dilakukan beberapa kali hingga diperoleh koloni bakteri yang benar-benar murni. Setelah pemurnian, setiap koloni tunggal yang memiliki bentuk berbeda kemudian diinokulasikan pada medium MRSA miring untuk stok isolat pengujian selanjutnya.

2.3.6 Pengamatan Morfologi Bakteri Probiotik

Morfologi setiap koloni tunggal yang terbentuk setelah pemurnian kemudian diamati. Pengamatan morfologi koloni bakteri yang dilakukan meliputi bentuk (*shape*), bentuk tepi (*margin*), warna (*colour*) dan permukaan koloni (*elevation*). Pengamatan morfologi sel bakteri dilakukan dengan teknik pewarnaan Gram. Pertama-tama ulasan bakteri dibuat pada kaca preparat dan dilakukan fiksasi. Selanjutnya, sebanyak 2-3 tetes gram A (kristal violet) diteteskan pada ulasan bakteri di atas kaca preparat, kemudian didiamkan selama 60 detik, lalu preparat dicuci dengan menggunakan air yang mengalir dan dikering anginkan. Selanjutnya, sebanyak 2-3 tetes gram B (larutan lugol) diteteskan pada ulasan bakteri, diamkan selama 60 detik, kemudian preparat dicuci dengan air yang mengalir dan dikering anginkan. Selanjutnya, ulasan bakteri ditetesi 2-3 tetes larutan alkohol-aseton, diamkan selama 60 detik, lalu preparat dicuci kembali dan dikering anginkan. Selanjutnya ulasan bakteri ditetesi dengan larutan safranin sebanyak 2-3 tetes, didiamkan selama 30 detik, lalu dicuci dan dikering anginkan. Setelah itu diamati di bawah mikroskop, terlebih dulu preparat ditetesi minyak imersi. Hasil pewarnaan (Bakteri Gram-positif berwarna ungu, sedangkan bakteri Gram-negatif berwarna merah).

2.3.7 Uji Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik

A. Uji Ketahanan Terhadap Keasaman Lambung (pH)

Uji ketahanan terhadap asam dilakukan dengan menggunakan medium MRSB (*de Mann Rogosa Sharpe Broth*) yang ditambahkan dengan HCL 0,1 N untuk mendapatkan pH 2,5-3 (sesuai dengan pH lambung). Sebanyak 1 ose masing-masing isolat bakteri diambil dari stok kultur, lalu diinokulasikan pada medium MRSB + HCL. Kemudian diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37 °C (Husain et al., 2017). Hasil positif apabila terjadi pertumbuhan bakteri pada medium MRSB + HCL setelah inkubasi yang ditandai dengan terbentuknya endapan pada tabung reaksi dan warna medium menjadi keruh.

B. Uji Ketahanan Terhadap Garam Empedu

Uji ketahanan terhadap garam empedu dilakukan dengan menggunakan medium MRSB (*de Mann Rogosa Sharpe Agar*) yang ditambahkan dengan garam empedu sintetik (*ox bile*), dengan konsentrasi 1% dan 5%. Sebanyak 1 ose, masing-masing isolat bakteri diambil dari stok kultur, lalu diinokulasikan pada medium MRSB garam empedu sintetik 1% dan 5%. Kemudian diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37 °C (Husain et al., 2017). Hasil positif apabila terjadi pertumbuhan bakteri pada medium MRSB garam empedu sintetik (*ox bile*) setelah inkubasi yang ditandai dengan terbentuknya endapan pada tabung reaksi dan warna medium menjadi keruh.

C. Uji Ketahanan Temperatur (Suhu)

Sebanyak 1 ose (ose bulat), masing-masing isolat bakteri diambil dari stok kultur diinokulasikan pada medium MRSB dalam tabung reaksi. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 15 °C, 37 °C dan 45 °C selama 2x24 jam. Hasil positif apabila terjadi pertumbuhan bakteri pada medium dan hasil negatif apabila tidak terjadi pertumbuhan bakteri pada medium.

2.3.8 Uji Karakterisasi Biokimia

Uji karakterisasi biokimia menurut Husain (2017):

A. Uji MR (*Methyl-Red*)

Sebanyak 1 ose (ose bulat), masing-masing isolat bakteri diambil dari stok kultur dan diinokulasikan pada medium MR-VP (*Methyl-Red Voges Proskauer*) cair dalam tabung reaksi. Selanjutnya diinkubasi selama 5x24 jam pada suhu 37 °C. Medium kemudian ditambahkan *methyl red* sebanyak 5 tetes. Hasil positif apabila terbentuk kompleks warna merah muda sampai merah pada medium, yang menandakan bahwa mikroba tersebut menghasilkan asam campuran.

B. Uji VP (*Voges Proskauer*)

Sebanyak 1 ose (ose bulat), masing-masing isolat bakteri diambil dari stok kultur dan diinokulasikan pada medium MR-VP cair dalam tabung reaksi. Selanjutnya diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 37 °C. Medium kemudian ditambahkan 0,2 mL KOH 40% dan 0,6 mL alfa-naftol, lalu

dikocok selama 30 detik. Hasil positif jika terbentuk kompleks warna lebayung pada medium.

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

Sebanyak 1 ose (ose bulat), masing-masing isolat bakteri diambil dari stok kultur kemudian diinokulasikan pada medium agar miring TSIA dengan metode tusuk pada bagian *butt* dan metode gores pada bagian *slant*. Selanjutnya diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37 °C. Perubahan yang diamati setelah diinkubasi adalah warna medium menjadi kuning menandakan asam, warna medium menjadi lebih merah menandakan medium menjadi lebih basa, warna menjadi hitam menandakan terbentuknya H₂S dan apabila medium terangkat menandakan bahwa mikroba tersebut mampu untuk memproduksi gas.

D. Uji Motilitas

Sebanyak 1 ose (ose bulat), masing-masing isolat bakteri diambil dari stok kultur dan diinokulasikan ke dalam medium SIM (*Sulfid Indole Motility*) dengan cara ditusuk tegak. Selanjutnya diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37 °C. Hasil positif apabila terdapat pola pertumbuhan yang menyebar (menyerupai akar pohon) di sekitar bekas tusukan jarum ose pada medium, yang menandakan bahwa mikroba tersebut melakukan pergerakan (motil) di dalam medium. Adapun hasil negatif apabila tidak terdapat pola pertumbuhan yang menyebar disekitar bekas tusukan jarum ose pada medium, yang menandakan bahwa mikroba tersebut tidak melakukan pergerakan (non motil).

E. Uji Katalase

Sebanyak 1 ose (ose bulat), masing-masing isolat bakteri diambil dari stok kultur kemudian diinokulasikan ke kaca preparat, lalu ditetesi reagen H₂O₂ (hidrogen peroksida). Hasil positif apabila terbentuk gelembung gas dan hasil negatif apabila tidak terbentuk gelembung gas.

2.3.9 Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri Patogen

A. Penyiapan Bakteri Uji

Digunakan bakteri uji yaitu *Staphylococcus 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 dihomegenkan menggunakan vortex serta dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil. Kemudian suspensi bakteri uji diukur transmittannya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nM hingga mencapai 25% T.

B. Penyiapan Kultur Bakteri Probiotik

Isolat bakteri probiotik dari stok diinokulasikan pada media MRSB 50 mL dan diinkubasi selama 1x24 jam menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 120rpm pada suhu ruang. Setelah itu, kultur bakteri probiotik

dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Kemudian kultur disentrifuge selama 10 menit hingga diperoleh supernatan dan pelet. Supernatan yang diperoleh selanjutnya digunakan pada uji antibakteri.

C. Uji Antibakteri

Sebanyak 1 mL isolat *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan kekeruhan 25% T diinokulasi pada media NA dengan metode tuang dan dibiarkan memadat. Sementara itu, *blank disk* steril direndam kedalam masing-masing supernatan bakteri probiotik isolat dari usus itik betina *Anas domesticus* dan ciprofloxacin sebagai kontrol positif selama 10 menit. Kemudian *blank disk* diletakan pada permukaan media NA yang telah memadat, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Diukur diameter hambatan yang terbentuk (mm) dengan menggunakan jangka sorong.

2.4 Analisis Data

Data yang 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 datanya yaitu data yang diambil dari diameter uji daya hambat terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.