

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PROBIOTIK ASAL USUS ITIK
JANTAN *Anas domesticus* DARI PESISIR DI DESA TAMASAJU
KECAMATAN GALESONG UTARA KABUPATEN TAKALAR**



**HAYATUL AZIZAH
H041 20 1019**



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

2024

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PROBIOTIK ASAL USUS ITIK
JANTAN *Anas domesticus* DARI PESISIR DI DESA TAMASAJU
KECAMATAN GALESONG UTARA KABUPATEN TAKALAR**

**HAYATUL AZIZAH
H041 20 1019**



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

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PROBIOTIK ASAL USUS ITIK
JANTAN *Anas domesticus* DARI PESISIR DI DESA TAMASAJU
KECAMATAN GALESONG UTARA KABUPATEN TAKALAR**

HAYATUL AZIZAH
H041 20 1019

Skripsi

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Biologi

pada

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

SKRIPSI**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PROBIOTIK ASAL USUS ITIK
JANTAN *Anas domesticus* DARI PESISIR DI DESA TAMASAJU
KECAMATAN GALESONG UTARA KABUPATEN TAKALAR****HAYATUL AZIZAH****H041 20 1019**

Skripsi,

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Biologi pada "18 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. 197001101997021Mengetahui:
Ketua Program StudiDr. Magdalena Litay, M. Sc.
NIP. 196409291989032002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Probiotik Asal Usus Itik Jantan *Anas domesticus* dari Pesisir di Desa Tamasaju Kecamatan Galesong Utara Kabupaten Takalar" 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, 11 Juni 2024


Hayatul Azizah
H041 20 1019

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah *Subhanahu wa Ta'ala* karena berkat rahmat-Nya dan hidayah-Nya sehingga penelitian ini dan skripsi ini dapat penulis rampungkan. Shalawat serta salam semoga dilimpahkan kepada baginda Rasulullah *shallallahu alaihi wasallam* beserta keluarga beliau dan sahabat hingga akhir zaman. Penulisan skripsi yang berjudul **“Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Probiotik Asal Usus Itik Jantan *Anas domesticus* dari Pesisir di Desa Tamasaju Kecamatan Galesong Utara Kabupaten Takalar”** merupakan upaya penulis 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. Selama proses penelitian maupun penyusunan skripsi ini, tidak sedikit hambatan maupun kendala yang penulis hadapi. Do'a dan dukungan dari berbagai pihak merupakan hal yang berarti, sehingga penyusunan skripsi ini dapat diselesaikan oleh penulis. Oleh karena itu, dengan tulus dan ikhlas, penulis mengucapkan terima kasih sebanyak-banyaknya. Teristimewa untuk kedua orang tuaku tercinta ayahanda Nyekreang dan Ibunda Dra. Daeng niupa yang senantiasa memberikan dukungan kepada penulis baik moril maupun materil, lantunan do'a, nasehat dan motivasi yang diberikan oleh penulis selama menempuh Pendidikan dari tingkat dasar hingga pada tingkat perguruan tinggi.

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. Drs. H. Muhtadin Asnady S., M.Si selaku Penasehat Akademik (PA) yang senantiasa memberikan arahan, dukungan dan bimbingan dari awal masa studi hingga penyusunan skripsi ini dan Ibu Prof. Dr. Sjafaraenan, 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. Kak Fuad Gani S.Si. selaku Laboran Mikrobiologi, terima kasih atas bimbingan, saran dan ilmunya selama proses perkuliahan, penelitian, hingga penyusunan skripsi ini
 7. Ainun Amini, Riska, Yosheline, dan Dhea Sagita, selaku partner penelitian dan teman perjuangan semasa kuliah, yang selalu menemani dan memotivasi mulai dari awal masa studi hingga sekarang.
 8. Sahabat-sahabat Penulis, terima kasih atas dukungan, bantuan, do'a dan kebersamaannya selama proses perkuliahan, penelitian hingga penyusunan skripsi ini, terkhusus kepada Sadiqah Yara Lailanun R, Annisa, Priscila Anandita, dan Hasnawati.
 9. Nayah, Aim, Mj, Nisa, Ince, Syalom, Ghazwul, Hazyim, dan Aldi sebagai teman KKN BOBA, terima kasih atas dukungan, bantuan dan kebersamaannya
 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, Dzulfaida Rajasa, Suci wulandari, dan Amelia Madani Putri 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 *Subhanahu wa Ta'ala*. Akhir kata, penulis memohon maaf atas kesalahan yang disengaja maupun tidak disengaja dalam rangkaian penyusunan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca.

Makassar, 11 Juni 2024

Hayatul Azizah
H041 20 1019

ABSTRAK

HAYATUL AZIZAH. **Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Probiotik Asal Usus Itik Jantan *Anas domesticus* dari Pesisir Desa Tamasaju Kecamatan Galesong Utara Kabupaten Takalar** (dibimbing oleh Dirayah Rauf Husain dan Eddyman W. Ferial).

Latar belakang. Probiotik sebagai *feed additive* dapat menjadi solusi alternatif dari penggunaan hormon atau AGP dalam meningkatkan efisiensi dan produksi ternak. Penggunaan probiotik yang umum dimanfaatkan adalah BAL. Sumber BAL yang potensial dapat diperoleh pada unggas yang dipelihara khususnya secara semi intensif. **Tujuan.** memperoleh isolat dan mengidentifikasi karakterisasi bakteri probiotik dari usus itik Jantan *Anas domesticus* di pesisir Desa Tamasaju Kecamatan Galesong Utara Kabupaten Takalar. **Metode.** Isolasi bakteri probiotik menggunakan medium MRSA yang ditambahkan CaCO_3 1%. Kemampuan sebagai bakteri probiotik diperoleh dengan melakukan uji ketahanan terhadap pH rendah, garam empedu dan temperatur. Karakteristik bakteri dilakukan melalui uji makroskopik dengan mengamati bentuk koloni, uji mikroskopik dilakukan dengan pewarnaan Gram. Dilakukan uji-uji biokimia seperti uji motilitas, uji MR-VP, uji katalase dan uji TSIA, serta uji daya hambat terhadap bakteri patogen dengan menggunakan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. **Hasil.** Diperoleh 5 isolat bakteri probiotik, 4 bersifat Gram positif dan bersifat Gram negatif, berbentuk coccus dan basil, mampu tumbuh pada medium dengan pH 2,5, medium yang mengandung garam empedu sintetik 1 % dan 5 %, temperatur 15 °C, 37 °C dan 45 °C, serta optimum pada temperature 37 °C dan 45 °C. Kelima isolat bersifat non motil, positif terhadap uji MR dan negatif terhadap uji VP, katalase negatif, dan mampu memfermentasi karbohidrat pada medium TSIA. Dari hasil uji daya hambat isolat PiTJ-1, PiTJ-3 dan PiTJ-5 mampu menghasilkan zona hambat sebesar 8-9 mm. **Kesimpulan.** Diperoleh 5 isolat yang menunjukkan karakteristik bakteri probiotik dan dari hasil uji daya hambat didapatkan isolat PiTJ-1, PiTJ-3 dan PiTJ-5 memiliki kemampuan menghasilkan antimikroba yang bersifat bakteriostatik terhadap pertumbuhan *E.coli* dan *S.aureus*.

Kata kunci: Probiotik, itik Jantan *Anas domesticus*, usus itik Jantan, Kabupaten Takalar

ABSTRAK

HAYATUL AZIZAH. **Isolation and Characterization of Probiotic Bacteria from the Intestines of Male Duck *Anas domestica* from the Coast of Tamasaju Village, North Galesong District, Takalar Regency** (Supervised by Dirayah Rauf Husain dan Eddyman W. Ferial).

Background. Probiotics as feed additives can be an alternative solution to the use of hormones or AGPs in increasing the efficiency and production of livestock. The common use of probiotics is LAB. Potential sources of LAB can be obtained in poultry raised especially semi-intensively. **Aim.** To isolate and characterize probiotic bacteria from the intestines of male *Anas domestica* duck in the coastal area of Tamasaju Village, North Galesong District, Takalar Regency. **Method.** Isolation of probiotic bacteria using MRSA medium added with 1% CaCO₃. The ability as probiotic bacteria was obtained by conducting resistance tests to low pH, bile salts and temperatures. Bacterial characteristics were carried out through macroscopic tests by observing the shape of colonies, microscopic tests were carried out by Gram staining. Biochemical tests were carried out 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*. **Results.** Obtained 5 isolates of probiotic bacteria, 4 are Gram positive and Gram negative, coccus-shaped and bacillus, able to grow on medium with pH 2.5, medium containing 1% and 5% synthetic bile salts, temperature 15 °C, 37 °C and 45 °C, and optimum at 37 °C and 45 °C. The five isolates are non-motile, positive for MR test and negative for VP test, negative catalase, and able to ferment carbohydrates on TSIA medium. From the results of the inhibition test, isolates PiTJ-1, PiTJ-3 and PiTJ-5 were able to produce an inhibition zone of 8-9 mm. **Conclusion.** Obtained 5 isolates that show the characteristics of probiotic bacteria and from the results of the inhibition test obtained isolates PiTJ-1, PiTJ-3 and PiTJ-5 have the ability to produce antimicrobials that are bacteriostatic against the growth of *E.coli* and *S.aureus*.

Keywords: Probiotics, Male duck *Anas domestica*, Male duck intestine, Takalar Regency

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	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Tujuan	2
1.3 Manfaat	3
1.4 Teori	3
1.4.1 Bakteri Probiotik	3
1.4.1.1 Batasan Probiotik	3
1.4.1.2 Karakteristik Bakteri Probiotik	4
1.4.1.3 Golongan Mikroorganisme Probiotik	5
1.4.1.4 Mekanisme Kerja Probiotik	6
1.4.1.5 Manfaat Probiotik	8
1.4.1.6 Sumber Isolat Probiotik	10
1.4.2. Tinjauan Umum itik <i>Anas domestica</i>	11
1.4.2.1 Deskripsi itik <i>Anas domestica</i>	11
1.4.3 Faktor Lingkungan dan Jenis Kelamin terhadap Mikrobiota Unggas ...	14
BAB II METODE PENELITIAN	16
2.1 Tempat dan Waktu	16
2.2 Alat dan Bahan	16
2.2.1 Alat	16
2.2.1 Bahan	16

2.3 Metode Kerja.....	16
2.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	16
2.3.2 Pembuatan Media	17
2.3.3 Pengambilan Sampel Itik Jantan <i>Anas domesticus</i>	18
2.3.4 Isolasi Bakteri Probiotik	18
2.3.5 Pemurnian Bakteri Probiotik.....	18
2.3.6 Pembuatan Stok Isolat Bakteri Probiotik	18
2.3.7 Pengamatan Morfologi Bakteri Probiotik	18
2.3.7.1 Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri	18
2.3.7.2 Pengamatan Morfologi Sel Bakteri (Pengecatan Gram).....	19
2.3.8 Uji Fisiologis Bakteri Probiotik	19
2.3.8.1 Uji Ketahanan Terhadap Keasaman Lambung (pH)	19
2.3.8.2 Uji Ketahanan Terhadap Garam Empedu	19
2.3.8.3 Uji Ketahanan Temperatur (Suhu)	19
2.3.9 Uji Karakteristik Biokimia	20
2.3.9.1 Uji MR (Methyl-Red)	20
2.3.9.2 Uji VP (Voges Proskauer)	20
2.3.9.3 Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)	20
2.3.9.4 Uji Motilitas	20
2.3.9.5 Uji Katalase	20
2.3.10 Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri Patogen	21
2.3.10.1 Penyiapan Bakteri Uji	21
2.3.10.2 Penyiapan Kultur Bakteri Probiotik	21
2.3.10.3 Uji Antibakteri	21
2.4 Analisis Data.....	21
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN	22
3.1 Pengambilan Sampel.....	22
3.2 Isolasi Bakteri Asam Laktat.....	23
3.3 Pemurnian Bakteri Asam Laktat.....	24
3.4 Pengamatan Morfologi Bakteri Asam Laktat (BAL).....	24
3.4.1 Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Asam Laktat	24
3.4.2 Pengamatan Morfologi Sel Bakteri Asam Laktat (Pengecatan Gram) ..	26
3.5 Uji Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik	27
3.5.1 Uji Ketahanan Terhadap Asam Lambung (pH)	27

3.5.2 Uji Ketahanan Garam Empedu	29
3.5.3 Uji Ketahanan Terhadap Suhu	31
3.6 Uji Biokimia	33
3.6.1 Uji MR (<i>Methyl-Red</i>).....	33
3.6.2 Uji VP (<i>Voges Prokauer</i>).....	33
3.6.3 Uji Motilitas	34
3.6.4 Uji TSIA (<i>Triple Sugar Iron Agar</i>)	35
3.6.5 Uji Katalase	36
3.7 Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri Patogen	36
BAB IV PENUTUP	40
4.1 Kesimpulan	40
4.2 Saran	40
DAFTAR PUSTAKA.....	41

DAFTAR TABEL

Nomor Urut	Halaman
1. Mikroorganisme yang digunakan Sebagai Probiotik.....	5
2. Hasil Pengamatan Morfologi BAL.....	25
3. Hasil Identifikasi Mikroskopik morfologi sel Isolat BAL	26
4. Hasil pengamatan Uji Ketahanan terhadap Asam Lambung.....	27
5. Hasil Pengamatan Uji terhadap Garam Empedu.....	29
6. Hasil Uji Ketahanan Isolat BAL terhadap Suhu	31
7. Zona Bening yang Terbentuk pada Uji Daya Hambat 24 jam dan 48 jam	38

DAFTAR GAMBAR

Nomor Urut	Halaman
1. Mekanisme aktivitas probiotik	6
2. Mekanisme probiotik bersaing dengan patogen	7
3. Itik <i>Anas domesticus</i>	11
4. Saluran pencernaan itik.....	13
5. Sampel itik <i>Anas domesticus</i>	22
6. Daerah jelajah itik Jantan <i>Anas domesticus</i>	22
7. Konsumsi makanan itik Jantan <i>Anas domesticus</i>	16
8. Hasil Isolasi Bakteri Probiotik pada pengenceran 10^{-4}	23
9. Hasil Pemurnian isolasi BAL	24
10. Hasil Pengamatan morfologi koloni BAL	25
11. Pewarnaan Gram isolat PiTJ-3.....	27
12. Hasil pengamatan ketahanan bakteri terhadap asam lambung (pH).....	28
13. Hasil pengamatan uji Ketahanan terhadap garam empedu 1 %	30
14. Hasil pengamatan uji ketahanan terhadap garam empedu 5 %.....	30
15. Uji ketahanan BAL pada suhu 15 °C	32
16. Uji ketahanan BAL pada suhu 37 °C	32
17. Uji ketahanan BAL pada suhu 45 °C	32
18. Hasil uji <i>Methyl Red</i> (MR).....	33
19. Hasil uji <i>Voges Proskauer</i> (VP)	34
20. Hasil uji motilitas.....	34
21. Hasil uji <i>Triple Sugar Iron Agar</i> (TSIA)	35
22. Hasil uji katalase.....	36
23. Hasil uji daya hambat isolat bakteri probiotik terhadap patogen 24 jam.....	37
24. Hasil uji daya hambat isolat bakteri probiotik terhadap patogen 48 jam.....	37

DAFTAR LAMPIRAN

No Urut	Halaman
1. Alur Penelitian	48
2. Alur Kerja Isolasi Bakteri Probiotik Itik Jantan <i>Anas domesticus</i>	49
3. Lokasi Pengambilan Sampel	50
4. Preparasi dan Proses Isolasi Bakteri Probiotik	50
5. Hasil Pemurnaian BAL dari Kab. Takalar	51
6. Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri	52
7. Morfologi Sel Bakteri	53
8. Uji Daya Hambat	54
9. Keterangan Kode Isolat	56

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Industri ternak unggas merupakan salah satu industri terbesar di dunia dan diperkirakan akan terus mengalami peningkatan. Produk dari ternak unggas berupa daging dan telur sebagai sumber bahan pangan dengan nilai gizi yang sangat diperlukan dan telah banyak dikonsumsi oleh masyarakat. Oleh karena itu, pentingnya keamanan pangan asal hewan ternak, khususnya unggas sangat perlu diperhatikan karena dapat berdampak kepada kesehatan yang mengkonsumsinya (Sinurat *et al.*, 2017; Ramlucken *et al.*, 2020). Kemudian diikuti oleh pola konsumsi masyarakat yang semakin sadar akan pentingnya protein hewani juga yang semakin tinggi, sehingga industri peternakan unggas memerlukan produksi dengan kuantitas yang tinggi dan kontinuitas guna memenuhi permintaan masyarakat.

Feed additive seperti antibiotik sebagai *growth promoter* (AGP) telah banyak digunakan oleh peternak sebagai solusi untuk meningkatkan produksi, kualitas telur, serta penggunaan AGP dalam pakan ternak juga dapat membunuh bakteri patogen. Namun, larangan penggunaan AGP dalam kegiatan produksi unggas di Indonesia telah diberlakukan berdasarkan Undang-Undang Peternakan dan Kesehatan No. 18, 2009 juncto No. 41 / 2014, pasal 22 ayat 4c yang menyatakan “setiap orang dilarang menggunakan bahan pakan yang dicampur dengan hormon tertentu atau antibiotik sebagai suplemen”. Pelarangan AGP didasarkan pada penelitian bahwa penggunaan antibiotik yang intens dan masif dapat berdampak pada timbulnya akumulasi bakteri yang resisten terhadap antibiotik dan adanya residu antibiotik yang terkandung pada produk hewani yang dapat mentransfer sifat resistensi dan menimbulkan potensi bahaya kesehatan bagi manusia (Varhan *et al.*, 2022). Berdasarkan permasalahan tersebut, penggunaan probiotik sebagai *feed additive* dapat menjadi solusi alternatif dari penggunaan hormon atau AGP dalam meningkatkan efisiensi dan produksi ternak.

Penggunaan probiotik yang umum dimanfaatkan adalah bakteri asam laktat (BAL). BAL merupakan anggota mikroba yang populasinya dapat ditemukan di dalam usus (saluran pencernaan) hewan dan manusia, terdapat pada tanaman, dan kotoran (Welsiliana *et al.*, 2023). Adapun BAL diantaranya termasuk spesies *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, dan *Tetragenococcus* merupakan mikroflora alami di *gastrointestinal tract* (GIT) manusia dan hewan yang ditandai dengan produksi asam laktat dan dapat diisolasi dan dipreparasi sebagai probiotik (Sirisopapong *et al.*, 2023).

Probiotik sebagai mikroorganisme hidup yang dapat menciptakan keseimbangan mikroflora di dalam saluran pencernaan ternak dan dapat mengeliminasi bakteri patogen pada usus, sehingga dapat meningkatkan kesehatan bagi tubuh inang (Andriani *et al.*, 2020). Bakteri bekerja dengan menekan mikroba pada usus yang bersifat patogen dan mengeluarkan enzim yang memperlancar pencernaan makanan. Probiotik memainkan peranan penting dalam merangsang

sistem pertahanan tubuh melawan penyakit dan meningkatkan kemampuan usus untuk menyerap sari-sari makanan, serta dapat menekan pertumbuhan populasi bakteri patogen di dalam usus (Clavijo dan Florez, 2018). Probiotik juga bertindak sebagai agen antimikroba melalui produk metabolit yang dihasilkan. Produk metabolit yang dihasilkan oleh probiotik adalah mikotoksin dan bakteriosin yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen pada saluran pencernaan inang (Negara dan Meilani, 2023).

Secara alami menurut Tsega *et al.* (2023) dalam hasil penelitiannya bahwa mikroflora dalam saluran pencernaan unggas, salah satunya itik dapat menjadi sumber yang sangat potensial untuk mendapatkan strain probiotik. Daya tahan itik terhadap penyakit yang lebih tinggi menjadikannya lebih unggul dibandingkan dengan ayam kampung maupun unggas lain (Depawole dan Sudarma, 2020). Sehingga menjadikannya sebagai sumber strain probiotik yang potensial. Terkhusus pada itik yang memiliki kebebasan dalam mencari pakan di lingkungan sekitar area peliharaannya akan mengalami perbedaan komposisi mikroflora dalam saluran pencernaan dengan itik yang pemeliharaannya dilakukan secara intensif dengan pemberian pakan rutin. Rahayu *et al.* (2019) mengatakan bahwa pola pemeliharaan akan berpengaruh terhadap produktivitas unggas (itik). Perbedaan konsistensi pemberian pakan pada pemeliharaan semi intensif dan intensif baik kualitas kandungan nutrisi maupun jenis pakan yang dikonsumsi, akan mempengaruhi mikroflora usus pada unggas. Hal ini didukung juga oleh pernyataan Prasetyo (2019) yang menyatakan bahwa salah satu faktor yang mempengaruhi mikroflora usus adalah pakan dan pemberiannya. Adapun pola pemeliharaan semi intensif memiliki ciri khas yaitu itik biasanya dibebaskan/diumbar lalu pakan tetap diberikan kepada ternak, biasanya 1 kali sehari. Ketika pemeliharaan diumbar maka akan timbul variasi konsumsi pakan dan asupan nutrisi yang diperoleh oleh itik, karena itik diberikan kesempatan untuk bebas mencari pakan (Rahayu *et al.*, 2019). Husain *et al.* (2020) juga mengemukakan dalam penelitiannya bahwa sumber bakteri asam laktat yang potensial dapat berasal dari unggas yang dipelihara di luar ruangan karena habitatnya di alam liar memungkinkan tingginya keanekaragaman hayati bakteri dalam saluran pencernaan. Variasi konsumsi pakan dan lingkungan akan mempengaruhi mikroflora usus yang ada pada itik. Sejalan bahwa faktor yang dapat mengubah mikrobiota usus yaitu, genetik inang, jenis kelamin, lingkungan, pola makan, usia dan cara lahir (Hasan dan Yang, 2019; Kim *et al.*, 2020).

Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian tentang isolasi dan karakterisasi bakteri probiotik asal usus itik jantan *Anas domesticus* dari pesisir Desa Tamasaju Kecamatan Galesong Utara Kabupaten Takalar.

1.2 Tujuan

1. Memperoleh isolat bakteri probiotik dari usus itik jantan *Anas domesticus* di pesisir Desa Tamasaju Kecamatan Galesong Utara Kabupaten Takalar
2. Mengidentifikasi karakteristik bakteri probiotik dari usus itik jantan *Anas domesticus* di pesisir Desa Tamasaju Kecamatan Galesong Utara Kabupaten Takalar.

1.3 Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah bahwa bakteri dari usus itik jantan *Anas domestica* pada pesisir Desa Tamasaju Kecamatan Galesong Utara, Kabupaten Takalar dapat dijadikan sebagai kandidat BAL yang potensial sebagai probiotik yang dilihat melalui uji karakteristik setelah dilakukan isolasi dan aktivitas daya hambatnya terhadap bakteri patogen. Selain itu, dapat menjadi referensi untuk penelitian selanjutnya.

1.4 Teori

1.4.1 Bakteri Probiotik

1.4.1.1 Batasan Probiotik

Istilah 'probiotik' berasal dari kata Yunani/Latin "*pro*" dan kata Yunani "*bios*", yang berarti "kehidupan". Probiotik merupakan istilah yang merujuk kepada mikroorganisme yang memberikan dampak positif terhadap manusia dan hewan. Mikroorganisme tersebut bekerja dengan cara menjaga keseimbangan mikroba usus dan berperan penting dalam mempertahankan kesehatan (Umasugi *et al.*, 2018).

Konsep probiotik tradisional awalnya dikemukakan oleh Elie Metchnikoff pada tahun 1907 yang menyarankan bahwa konsumsi rutin produk susu fermentasi dengan bakteri asam laktat (BAL), seperti yogurt, dikaitkan dengan peningkatan kesehatan dan umur panjang pada lansia rakyat Bulgaria. Sejak saat itu, istilah probiotik selalu dikaitkan dengan bakteri yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh. Kemudian, Lilley dan Stillwell pada tahun 1965 yang menyatakan bahwa probiotik sebagai substansi yang dihasilkan oleh satu mikroba yang dapat menstimulasi pertumbuhan mikroba lain. Selanjutnya oleh Parker (1974) menjelaskan probiotik sebagai organisme atau substansi yang memiliki kontribusi terhadap keseimbangan mikroba intestinal. Definisi probiotik selanjutnya diperbaiki oleh Fuller (1989) mengemukakan probiotik yang berarti suplemen makanan berupa mikroba hidup yang memiliki efek menguntungkan bagi inang yang mengkonsumsi melalui keseimbangan mikroba intestinal (Martín dan Langella, 2019).

Definisi probiotik terus mengalami perkembangan setelah dianalisis secara cermat oleh beberapa ahli. Saat ini, definisi yang paling diterima oleh komunitas ilmiah adalah definisi yang diajukan oleh panel ahli yang diselenggarakan oleh Asosiasi Ilmiah Internasional Probiotik dan Prebiotik (ISAPP) pada tahun 2014. ISAPP mendefinisikan probiotik sebagai "mikroorganisme hidup yang jika diberikan dalam jumlah yang cukup, memberikan manfaat kesehatan bagi inang". Berdasarkan definisi tersebut mengklasifikasikan mikroba yang digunakan sebagai alat bantu pengolahan atau sumber senyawa bermanfaat dan dengan mikroba yang digunakan terutama untuk kepentingan kesehatan. Selain itu, perbedaan antara mikroorganisme komensal dan probiotik juga disimpulkan dari definisi ini. Meskipun bakteri komensal dalam saluran pencernaan (usus) seringkali menjadi sumber strain probiotik, sampai strain tersebut dilakukan isolasi dan karakterisasi, maka hal tersebut tidak dapat disebut sebagai 'probiotik' (Hill *et al.*, 2014). Oleh karena itu, bakteri probiotik pada produk pangan tidak hanya harus mempunyai sifat fungsional

dan bermanfaat bagi kesehatan manusia, tetapi juga harus mampu bertahan dalam organ pencernaan (Durazzo *et al.*, 2020).

Beberapa jenis bakteri menguntungkan telah dan sementara dikembangkan sebagai probiotik diantaranya jenis-jenis BAL, sebagian besar jenis bakteri pada probiotik berasal dari *Lactobacillus* atau *Bifidobacterium*. Penggunaan probiotik digambarkan sebagai alternatif antibiotik dan telah dianjurkan untuk digunakan pada ayam dan beberapa unggas lainnya, karena berperan dalam pencegahan penyakit, pengurangan angka kematian, toleransi terhadap stress lingkungan, dan peningkatan produktivitas (Umasugi *et al.*, 2018; Yadav dan Jha, 2019).

1.4.1.2 Karakteristik Bakteri Probiotik

Probiotik sebagai mikroba hidup yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi komunitas mikroba lingkungan hidupnya. Mikroorganisme yang akan dijadikan sebagai probiotik memiliki persyaratan, yaitu tidak bersifat patogen bagi inang, tidak bersifat patogen bagi konsumen, dapat hidup dan bertahan serta berkembang biak di dalam lingkungan saluran pencernaan inang (Supriatna *et al.*, 2016). Sejalan dalam penelitian Febricia *et al.* (2020) mengemukakan bahwa probiotik merupakan bakteri asam laktat (BAL) yang dapat menguntungkan bagi saluran pencernaan karena dapat meningkatkan keseimbangan mikroflora usus dan mampu bertahan hidup dalam keasaman lambung sehingga dapat menempati usus dalam kuantitas yang cukup besar. Bakteri probiotik dapat tahan terhadap pH rendah, garam empedu, enzim pencernaan, mampu melakukan agregasi, menempel, dan berkolonisasi di usus, serta dapat berinteraksi melawan patogen, seperti *E. coli*.

Syarat utama strain yang dapat digunakan sebagai agensia probiotik adalah sebagai berikut (Ayivi *et al.*, 2020) :

1. Memiliki resistensi terhadap asam dan garam empedu sehingga dapat mencapai intestinal dan memiliki kemampuan menempel pada mukosa intestin.
2. Kemampuannya menghasilkan substansi antimikroba sehingga mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen enterik. jenis substansi antimikroba yang dihasilkan oleh BAL adalah asam organik, hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin
3. Tumbuh baik secara in vitro, memiliki stabilitas dan viabilitas yang tinggi saat dalam pengiriman dengan kendaraan, setelah kultur, manipulasi dan pengemasan sebelum dikonsumsi dan aman bagi manusia.

Lactobacillus dan *bifidobacterium* merupakan BAL intestinal yang banyak digunakan sebagai agensia probiotik. Dari uji secara in vitro diketahui bahwa *Lactobacillus* mampu menghambat berbagai jenis bakteri patogen seperti *Salmonella*, *Shigella* dan *Staphylococcus*. Sejumlah *Lactobacillus* mampu menghasilkan komponen antimikroba yang disebut bakteriosin misalnya asidolin, asidofilin maupun laktosidin yang diperkirakan memiliki spektrum luas baik terhadap bakteri gram positif maupun negatif (Ahmed *et al.*, 2010).

1.4.1.3 Golongan Mikroorganisme Probiotik

Sebagian besar galur probiotik diklasifikasikan sebagai bakteri asam laktat (BAL). BAL didefinisikan sebagai kelompok bakteri yang membentuk asam laktat, baik sebagai satu-satunya produk maupun sebagai produk utama pada metabolisme karbohidrat. BAL adalah salah satu jenis bakteri gram positif yang tidak membentuk spora, berbentuk bulat atau batang, suhu optimum ± 40 , non-motil, bersifat anaerob, katalase negatif dan hasil oksidase positif, dan dengan asam laktat sebagai produk utama fermentasi karbohidrat (Hafifah *et al.*, 2017). BAL termasuk dalam kelompok bakteri baik dan umumnya memenuhi status GRAS (*Generally Recognized as Safe*), yaitu aman bagi manusia. Hal ini karena bakteri asam laktat dapat menghambat secara alami mikroba patogen (Alfinda *et al.*, 2022).

Dalam Nasution *et al.* (2023) mengemukakan yang dikutip dari Purwandhani dan Rahayu (2003) bahwa organisme pembentuk asam laktat terbagi dua spesies, yaitu :

- a) Spesies homofermentatif yang mampu mengubah 95% heksosa mejadi asam laktat,
- b) Spesies heterofermentatif, merupakan grup yang memproduksi asam laktat dalam jumlah sedikit dan produk yang dihasilkan yaitu etil alkohol, asam asetat, asam format dan karbondioksida.

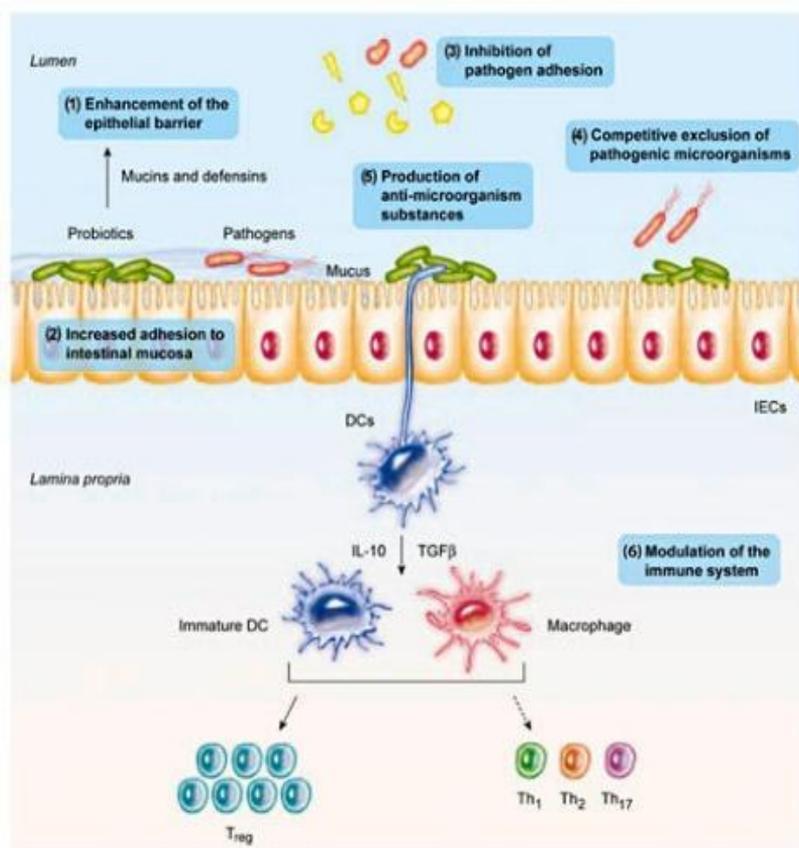
Tabel 1. Mikroorganisme yang digunakan sebagai probiotik (Zheng *et al.*, 2020).

<i>Lactobacillus</i> species	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
<i>Bifidobacterium</i> species	
<i>B. bifidum</i>	<i>B. animalis</i>
<i>B. breve</i>	<i>B. infantis</i>
<i>B. longum</i>	<i>B. lactis</i>
<i>B. adolescents</i>	
Others	
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactococcus lactis</i> sub sp. <i>lactis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lactococcus lactis</i> sub sp. <i>cremoris</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>

1.4.1.4 Mekanisme Kerja Probiotik

Bakteri probiotik dapat memberikan berbagai efek positif terhadap kesehatan melalui berbagai mekanisme. Dari berbagai efek yang muncul, efek yang paling utama adalah menjaga keseimbangan mikroflora pada intestin dan memiliki efek antidiare akibat patogen enterik. Mekanisme probiotik di dalam mikroflora yang seimbang adalah melalui kompetisi nutrisi, kompetisi reseptor untuk penempelan pada sel epitel, produksi antimikroba, dan stimulasi imunitas pada ekosistem endogenus (Lamprecht *et al.*, 2012).

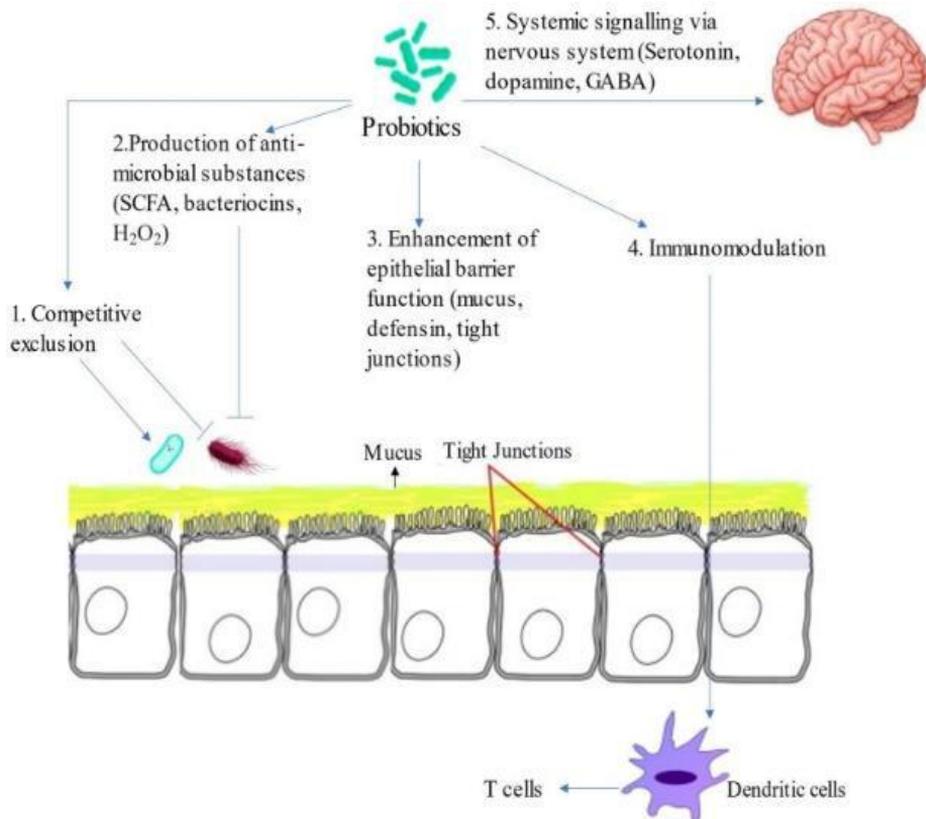
Bermudez-Brito *et al.* (2012) juga menjelaskan mengenai mekanisme utama dari aktivitas probiotik meliputi peningkatan barrier epitelial, peningkatan adhesi ke mukosa usus, serta inhibisi bersamaan dari adhesi patogen, eksklusi bersaing terhadap mikroorganisme patogen, produksi zat antimikroba, dan modulasi sistem kekebalan.



Gambar 1. Mekanisme aktivitas probiotik (Brito *et al.*, 2012)

Probiotik bekerja dengan bersaing dengan bakteri patogen untuk memperoleh nutrisi dan situs pengikatan reseptor, sehingga membuat patogen sulit bertahan di saluran pencernaan. Selain itu, probiotik bertindak sebagai agen antimikroba dengan memproduksi zat seperti asam lemak rantai pendek, asam

organik, hidrogen peroksida, dan bakteriosin yang dapat mengurangi keberadaan bakteri patogen di usus. Selain itu, probiotik juga bekerja dengan meningkatkan fungsi barrier usus dengan merangsang produksi protein mukin, mengatur ekspresi protein pengikatan ketat, seperti okcludin dan kladin 1, dan mengatur respons imun di dalam usus (Latif *et al.*, 2023)



Gambar 2. Mekanisme probiotik bersaing dengan patogen (Latif *et al.*, 2023).

Mekanismenya sebagai berikut (Sumarsih *et al.* (2012); Latif *et al.*, 2023):

1. Persaingan nutrisi dan reseptor: Probiotik bersaing dengan patogen untuk nutrisi dan reseptor pengikatan di saluran pencernaan, sehingga membuat patogen sulit bertahan hidup dan melekat pada mukosa usus. Substrat bahan makanan yang mendukung perkembangan mikroba probiotika dalam saluran pencernaan disebut “prebiotik”. Kemudian dengan kemampuan adhesi tinggi pada sel-sel usus, probiotik menciptakan lingkungan yang mendukung pertumbuhan optimal dan mengurangi bakteri patogen. Beberapa bakteri probiotik seperti *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* dan sejumlah besar *Bifidobacteria* menunjukkan kemampuan adhesi yang kuat pada sel-sel usus.
2. Produksi zat antimikroba: Mikroba probiotik juga dapat mensekresikan produk antimikroba yang disebut bakteriosin. Sebagai contoh *Lactobacillus*

acidophilus menghasilkan dua komponen bakteriosin yaitu bakteriosin lactacin B dan acidolin. Bakteriosin lactacin B dan acidolin yang memiliki kemampuan bekerja menghambat berkembangnya mikroorganisme patogen

3. Peningkatan fungsi penghalang epitel: Probiotik meningkatkan fungsi penghalang epitel dengan meningkatkan produksi lendir dan meningkatkan ekspresi protein ikatan ketat. Ini mencegah patogen berpindah dari usus ke dalam aliran darah.
4. Regulasi kekebalan: Probiotik berperan dalam mengatur sistem kekebalan tubuh dengan mempengaruhi pematangan dan fungsi sel dendritik yang dapat meningkatkan aktivitas sel T yang sangat penting untuk keseimbangan kekebalan.
5. Regulasi neurotransmitter: Probiotik juga memiliki kemampuan untuk mengatur produksi neurotransmitter seperti serotonin, dopamin, dan *gamma-aminobutyric acid* (GABA) yang dapat mempengaruhi suasana hati dan kesejahteraan secara keseluruhan.

Lactobacillus dan *bifidobakterium* yang merupakan penghuni alami jalur intestin dan merupakan bakteri yang banyak digunakan sebagai agensia probiotik. Bakteri ini ditemukan pada membran mukosa. Dari uji secara in vitro diketahui bahwa *Lactobacillus* mampu menghambat berbagai jenis bakteri patogen seperti *Salmonella*, *Vibrio*, *Listeria*, *Shigella* dan *Staphylococcus*. Beberapa *Lactobacillus* mampu menghasilkan komponen antimikroba yang disebut bakteriosin misalnya asidolin, asidofilin maupun laktosidin yang diperkirakan memiliki spektrum luas baik terhadap bakteri gram positif maupun negatif. *Bifidobacterium* adalah bakteri yang mampu menghasilkan asam asetat, format, laktat dari fermentasi gula. Asam asetat yang dihasilkan yang dihasilkan memiliki aktivitas daya hambat terhadap bakteri Gram negatif. Sifat inilah yang menguntungkan penggunaan *Bifidobacterium* dibandingkan dengan *Lactobacillus* dalam menekan pertumbuhan bakteri Gram-negatif (Dewi dan Rahmiati, 2019).

1.4.1.5 Manfaat Probiotik

Probiotik didefinisikan sebagai substrat mikroorganisme yang diberikan kepada manusia atau ternak melalui pakan dan memberikan efek positif dengan cara memperbaiki keseimbangan mikroorganisme alami di dalam saluran pencernaan. Selain itu, probiotik untuk memperbaiki komposisi mikroorganisme yang hidup di bagian usus halus ternak untuk meningkatkan produktivitasnya dan untuk menghindari diare akibat stress karena perubahan pakan. Keberadaan bakteri asam laktat dalam saluran pencernaan penting untuk menjaga keseimbangan ekosistem mikroflora dalam usus. Bakteri-bakteri tersebut menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen. Mikroflora yang digolongkan sebagai probiotik adalah bakteri asam laktat (BAL) yang dapat memproduksi asam laktat terutama dari golongan *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria*. Beberapa penelitian menyatakan bahwa BAL mampu menekan jumlah bakteri patogen penyebab gangguan pencernaan, mampu membentuk koloni, sehingga menjaga

keseimbangan bakteri yang menguntungkan dalam usus dan meningkatkan kekebalan tubuh (Dewi dan Rahmiati, 2019).

Peran probiotik terutama adalah menciptakan keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan. Keseimbangan terbentuk karena bakteri probiotik berkolonisasi dengan menempel pada mukosa saluran pencernaan. Kolonisasi ini menghambat bakteri patogen untuk menempel. Keadaan ini mengakibatkan terciptanya kondisi yang optimum untuk pencernaan pakan. Pencernaan yang baik mengakibatkan terjadi peningkatan efisiensi konversi pakan untuk diubah menjadi daging. Penggunaan probiotik pada ternak unggas dilaporkan oleh Fuller (2001) juga dapat menurunkan aktivitas urease. Urease adalah suatu enzim yang bekerja menghidrolisis urea menjadi ammonia. Hidrolisis ini yang mengakibatkan pembentukan ammonia menjadi berkurang. Amonia merupakan salah satu bahan yang dapat menyebabkan terjadinya keracunan pada sistem pernapasan pada unggas (Putra dan Humaidah, 2022).

Probiotik memberikan efek positif pada sistem kekebalan mukosa, lingkungan usus, dan fungsi penghalang epitel dan mukosa. Selain itu, juga dapat digunakan untuk mengatasi masalah nafsu makan buruk dan gangguan pencernaan, serta meningkatkan respons imun terhadap vaksin. Keuntungan probiotik juga melibatkan peranannya sebagai antioksidan, antiinflamasi, anti-alergi, anti-kanker, anti-mutagenik, anti-diabetes, dan agen anti-viral yang efektif melawan virus-virus unggas (Alloui *et al.*, 2013). Probiotik dapat menghambat bakteri patogen melalui produksi asam organik dan zat antibakteri, yaitu hidrogen peroksida, bakteriosin, dan defensin. Asam dipicolinik dan asam lemak akan memblokir adhesi bakteri patogen pada pengikatan epitel usus dengan hambatan kompetitif, memodulasi respon imun inang dengan memengaruhi sel T_{reg} , sel antigen, sel T dan sel B efektor, serta entrosit, dan meningkatkan sekresi enzim pencernaan sehingga membantu proses pencernaan. Probiotik juga dapat mengatur produksi sitokin anti dan proinflamasi untuk menstimulasi produksi antibodi, serta meningkatkan aktivitas sel NK (Algawany *et al.*, 2018).

Probiotik dapat memiliki efek anti-alergi dengan memengaruhi respons sistem kekebalan tubuh terhadap alergen. Penyakit alergi terjadi respon berlebihan dari sistem kekebalan tubuh terhadap antigen tertentu. Probiotik dapat mempengaruhi keseimbangan sel Th_1/Th_2 dalam sistem kekebalan tubuh, membantu mengurangi respon yang berlebihan dari sel Th_2 yang berkontribusi pada alergi. Selain itu, juga dapat mempengaruhi sel dendritik yang mengatur respons imun dan sel T_{reg} yang membantu menjaga keseimbangan imun tubuh.

Beberapa spesies probiotik, seperti *Lactiplantibacillus plantarum* dan *Limosilactobacillus reuteri*, telah menunjukkan efek anti-alergi dengan mengurangi produksi zat-zat yang terlibat dalam reaksi alergi dan memengaruhi keseimbangan mikroflora usus (Latif *et al.*, 2023).

Probiotik dapat menurunkan kadar kolesterol dengan cara menghambat produksi kolesterol baru dan mengurangi penyerapan kolesterol makanan. Memecah garam empedu, mengurangi penyerapannya, dan meningkatkan pengeluaran garam empedu melalui tinja. Beberapa strain probiotik telah mengurangi kadar kolesterol

dalam tubuh dan meningkatkan ekskresi kolesterol melalui tinja. Studi genetik menunjukkan bahwa probiotik dapat mempengaruhi ekspresi gen terkait kolesterol dalam tubuh (Latif *et al.*, 2023).

Usus memainkan peran penting dalam pencernaan dan penyerapan nutrisi serta menjaga integritas penghalang mukosa. Banyak bakteri komensal yang tinggal di saluran pencernaan manusia membentuk komunitas yang aktif, yang kuat mempengaruhi fisiologi manusia (Shehata *et al.*, 2022). Fungsi probiotik sebagai pertahanan mukosa, fungsi proteksi dan pertahanan imunitas saluran cerna seperti misalnya lapisan epitel, lapisan mukus, peristaltik, dan deskuamasi epitel, serta sekresi immunoglobulin A (IgA), sangat berpengaruh terhadap perlekatan bakteri patogen dan juga untuk modulasi sistem imun lokal dan sistemik. Probiotik mengubah komposisi, atau keseimbangan, dari mikrobiota, baik dalam lumen dan pada permukaan mukosa. Prebiotik juga bertindak sebagai karbon dan sumber energi bagi bakteri yang tumbuh di usus besar, dimana mereka difermentasi dan merupakan sumber energi untuk usus dan jaringan tubuh lainnya (Latif *et al.*, 2023).

1.4.1.6 Sumber Isolat Probiotik

Bakteri probiotik dapat diisolasi dari berbagai sumber, salah satunya dari saluran pencernaan hewan (Rahmiati dan Mumpuni, 2017). Mikroba yang berpotensi dijadikan probiotik adalah kelompok bakteri asam laktat (BAL). BAL memiliki kemampuan untuk merombak senyawa kompleks menjadi sederhana dan menjadikannya asam laktat dan menghasilkan produk antimikroba (Putra & Humaidah, 2022).

Beberapa jenis BAL terdapat disaluran pencernaan, di antaranya *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus johnsonii*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus vitulinus*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus reuteri*, *L. acidophilus*, dan *L. gasser* (Aini *et al.*, 2021).

Lactobacillus dan *bifidobakterium* yang merupakan penghuni alami jalur intestin merupakan bakteri yang banyak digunakan sebagai agensia probiotik. Bakteri ini ditemukan pada membran mukosa. Penggunaan BAL sebagai probiotik pada ternak unggas idealnya juga berasal dari unggas, hal ini disebabkan oleh kemampuan adaptasi pada lingkungannya lebih mudah, sehingga cepat diperoleh keseimbangan mikroflora usus pada unggas tersebut. *Lactobacillus salivarius* dan *lactobacillus animalis* yang diisolasi dari saluran pencernaan itik mampu bertahan hidup pada pH 1 selama 1 jam inkubasi (Risna *et al.*, 2022).

Secara alamiah BAL berada di dalam usus unggas, akan tetapi keberadaannya relatif tidak stabil karena dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan pakan. Kelompok bakteri asam laktat merupakan mikroflora normal dalam saluran pencernaan unggas terutama yang hidup dalam usus halus dan usus besar (Welsiliana *et al.*, 2023). Usus merupakan pusat dari kesehatan saluran pencernaan setiap makhluk hidup, karena di dalam usus terdapat berbagai macam mikroflora yang apabila dalam kondisi yang seimbang dapat memberikan

pengaruh positif terhadap kesehatan. Kondisi mikroflora usus yang seimbang membantu pertumbuhan vili-vili usus sehingga meningkatkan fungsi barier usus sebagai pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri patogen (Nugraha *et al.*, 2021).

Itik *Anas domesticus* yang sehat umumnya dicirikan memiliki usus yang berfungsi dengan baik. Hal ini penting dalam mengkonversi pakan yang efisien untuk pemeliharaan dan untuk pertumbuhan atau produksi. Salah satu ciri terpenting dari usus yang berfungsi dengan baik adalah keseimbangan populasi bakterinya (Maki *et al.*, 2019). Tao *et al* (2019) juga menyatakan bahwa dalam usus itik petelur terdapat keanekaragaman mikroflora usus yang mempengaruhi produktivitas itik, diantaranya adalah golongan bakteri *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, dan *Firmicutes*. Golongan yang paling dominan adalah *Proteobacteria*. Tingkat genus, golongan *Lactobacillus* menjadi bakteri yang mendominasi di dalam usus itik. Bakteri golongan *Lactobacillus* dapat memperbaiki kondisi saluran usus baik secara morfologi, kondisi mikrobiota, dan mempertahankan produktivitas itik terutama pada saat terkena cekaman panas (*heat stress*) (Nugroho *et al.*, 2021).

1.4.2 Tinjauan Umum Itik *Anas domesticus*

1.4.2.1 Deskripsi Itik *Anas domesticus*



Gambar 3. Itik *Anas domesticus*

Itik *Anas domesticus* merupakan salah satu plasma nutfah ternak Indonesia. Ternak itik memiliki keunggulan dibandingkan dengan ternak unggas lainnya yaitu lebih tahan terhadap penyakit. Pemeliharaan mudah dan efisien dalam mengubah pakan. Ternak itik berbeda dengan jenis unggas lainnya, walaupun menggunakan pakan berkualitas rendah, namun tetap memproduksi telur. Itik yang dipelihara dengan sistem pemeliharaan tradisional dapat menghasilkan telur 100-150 butir/ekor/tahun. Peternakan itik di Indonesia umumnya bertujuan untuk memproduksi telur. Banyaknya permintaan daging itik membuat ternak itik perlu

dikembangkan dan telur itik yang dapat dibuat asin juga tak kalah dibutuhkan oleh masyarakat, sehingga semakin tingginya ketersediaan daging dan telur itik yang diperlukan (Sumaryani dan Permatasari, 2020).

Kandungan protein yang terdapat pada daging itik yaitu sebesar (20,04%), lemak (8,2%) (Wati *et al.*, 2021). Daging itik dikenal sebagai salah satu jenis daging yang mempunyai nilai ekonomi yang lebih tinggi dibandingkan dengan daging ayam. Kelebihan berdasarkan sifat kimia, daging itik memiliki sumber protein bermutu tinggi dan mampu memproduksi dengan baik dan tahan terhadap penyakit. Adapun klasifikasi Itik *Anas domesticus* sebagai berikut:

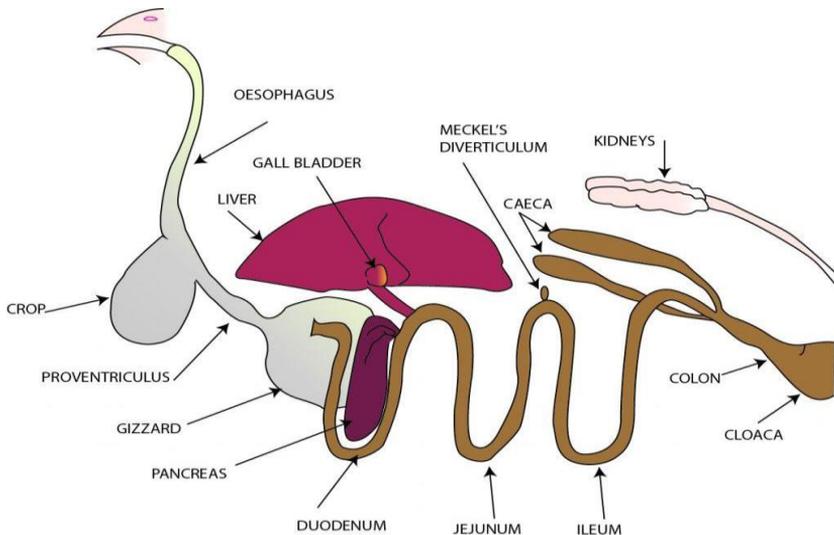
Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Aves
Ordo	: Anseriformis
Family	: Anatidae
Genus	: <i>Anas</i>
Spesies	: <i>Anas domesticus</i>

Menurut Reston *et al.* (2022) dalam Suharsono (2009) dibanding dengan unggas jenis lainnya, itik mempunyai keunggulan sebagai berikut:

- a. Bila dipelihara dengan sistem pengelolaan yang lebih sederhana sekalipun, itik masih mampu memproduksi dengan baik
- b. Tingkat kematian (mortalitas) itik umumnya kecil dan lebih tahan terhadap penyakit
- c. Itik selalu bertelur di pagi hari. Dengan demikian, kegiatan pengambilan telur hanya dilakukan sekali sehari sehingga peternak dapat melakukan kegiatan lainnya
- d. Walaupun pakan kualitas rendah, itik masih bisa memproduksi

Itik dapat menyebar ke kawasan yang luas karena akuatik. Selain itu, dalam hal makanan itik bersifat omnivora (pemakan segala), mulai dari biji-bijian, rumput-rumputan, umbi-umbian, dan makanan yang berasal dari hewan atau binatang kecil. Sifat spesifik dari itik adalah kakinya relatif pendek dibanding tubuhnya, antara jari yang satu dan jari yang lain dihubungkan oleh selaput renang, serta bulu-bulunya tebal dan berminyak sehingga dapat menghalangi air masuk ke tubuhnya ketika berada dalam air. Dengan sifat seperti ini, meskipun sudah dijinakkan, itik cenderung menyukai hidup di air (Reston *et al.*, 2022).

Proses pencernaan unggas terdiri dari pencernaan secara mekanik (fisik), kimiawi (enzimatis) maupun secara mikrobiologis, sehingga terjadi proses perombakan makanan dan siap diserap oleh saluran pencernaan. Hasil dari proses 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 (Hamzah, 2013).



Gambar 4. Saluran pencernaan itik

Organ pencernaan pada itik adalah sebagai berikut (Yuwanta, 2004; Reston *et al.*, 2023):

- a) **Mulut:** Mulut pada unggas terdiri atas paruh, ruang paruh, dan lidah. Fungsi utamanya adalah sebagai alat pengambilan pakan (prehension). Unggas tidak memiliki gigi, sehingga fungsi pemecahan partikel digantikan oleh paruh. Mulut hanya berfungsi sebagai lewat sesaat untuk bahan pakan. Pencernaan di mulut juga terjadi secara enzimatik, dengan saliva yang mengandung amilase dan maltase saliva. Meski produksi saliva rendah, mulut membantu membasahi pakan agar mudah ditelan.
- b) **Esophagus:** makanan masuk ke esophagus semata-mata oleh adanya gravitasi (gaya berat) makanan dan karena tekanan yang lebih rendah di dalam ruang esophagus oleh leher yang dijulurkan ke atas. Demikian juga halnya dengan proses menelan air. Laju ransum sepanjang esofagus juga dibantu oleh distensibilitas dinding sel dan mucus yang disekresikan oleh kelenjar saliva dan kelenjar esofagus.
- c) **Tembolak :** merupakan pelebaran dinding esophagus. Pada itik dan unggas air pada umumnya tembolok tidak berkembang dengan sempurna. Tidak seperti pada ayam atau burung-burung pemakan rumput. Tembolok hanya berfungsi sebagai penampung sementara bagi makanan. Makanan dilunakkan dengan bantuan saliva dari mulut serta dari kelenjar esophagus.
- d) **Perut:** terdiri atas perut kelenjar (proventrikulus) dan perut muscular (ventrikulus) sebagai alat penghancur makanan (mekanik). Proventrikulus pada unggas merupakan perbesaran terakhir dari esofagus dan berfungsi sebagai perut sejati. Di dalam proventrikulus terjadi sekresi asam hidroklorik yang bersifat asam, berguna untuk melunakkan dan memecah ransum. Proventrikulus merupakan tempat dimulainya pencernaan dengan enzim, termasuk pepsin yang membantu pencernaan protein dan *hydrochloric acid*

dihasilkan oleh *glandular cell*. Proventrikulus memiliki ukuran lebih kecil, lebih tebal, dan pH lebih rendah daripada esofagus, serta mensekresikan lebih banyak enzim pencernaan.

- e) *Gizzard* : berperan untuk membantu proses pencernaan secara mekanis untuk pakan yang keras, *gizzard* terletak setelah ventriculus. *Gizzard* terdiri dari serabut otot yang padat dan kuat, sehingga dapat memberikan tenaga yang besar dan juga memiliki mukosa yang lebih tebal.
- f) Usus halus (intestin) terdiri atas duodenum, jejunum dan ileum sepanjang. Pada duodenum, terjadi sekresi enzim pankreatik seperti amilase, lipase, dan tripsin. Dinding usus halus juga menghasilkan beberapa enzim yang mencerna karbohidrat dan protein. Getah usus yang dihasilkan mengandung erepsin dan enzim pemecah gula. Erepsin membantu menyempurnakan pencernaan protein, menghasilkan asam-asam amino, dan memecah gula menjadi monosakarida yang dapat diserap oleh tubuh. Usus halus berperan penting dalam absorpsi hasil pencernaan ransum, yang sebagian besar terjadi di sana. Inilah tempat di mana nutrisi yang sudah dicerna diserap oleh tubuh unggas.
- g) Seka : Seka, juga dikenal sebagai usus buntu, terletak di antara usus halus dan usus besar pada unggas. Ujung-ujungnya merupakan saluran buntu. Meskipun fungsi utama seka belum sepenuhnya diketahui, namun di dalamnya terjadi sedikit pencernaan karbohidrat dan protein, serta proses absorpsi air.
- h) Usus besar : Usus besar pada unggas merupakan kelanjutan dari saluran pencernaan setelah usus buntu dan kloaka. Tidak menghasilkan enzim pencernaan, usus besar utamanya terlibat dalam pencernaan sisa-sisa enzim dari usus halus. Selain itu, usus besar berperan dalam reabsorpsi air untuk menjaga keseimbangan cairan tubuh. Fungsinya melibatkan pengaturan konsistensi tinja dan memastikan unggas tetap terhidrasi.
- i) Kloaka : lubang pengeluaran sisa-sisa pencernaan.

1.4.3 Faktor Lingkungan dan Jenis Kelamin terhadap Mikrobiota Unggas

Variasi komposisi mikrobiota usus pada unggas berperan penting dalam kualitas produksi, kesehatan secara keseluruhan dan ketahanan terhadap infeksi mikroba. Selain itu, variasi komposisi mikrobiota usus juga dapat dipengaruhi oleh karakteristik inang dan faktor lingkungan yang berbeda. Adapun untuk karakteristik inang, salah satunya yaitu terkait seks (jenis kelamin). Pada unggas, perbedaan jenis kelamin merupakan bagian dari sistem produksi yang berbeda, karena kelompok unggas petelur sebagian besar terdiri dari betina, sedangkan pada kelompok pedaging, jantan dan betina sering dipelihara bersama. Unggas pedaging jantan umumnya memiliki laju pertumbuhan lebih tinggi dan *feed conversion ratio* (FCR) lebih rendah dibandingkan ayam pedaging betina. Perbedaan komunitas bakteri antara unggas pedaging jantan dan betina juga dipengaruhi oleh faktor yang tidak berhubungan dengan pertumbuhan. Penelitian lain yang membandingkan unggas

(ayam) betina dan jantan (umur 22 dan 42 hari) menggunakan PCR kuantitatif (qPCR), menunjukkan perbedaan kelimpahan *Lactobacillus salivarius*, *L. crispatus*, *L. aviarius*, dan *E. coli* pada saluran pencernaan (Torok *et al.*, 2013; Kers *et al.*, 2018). Penelitian England *et al.* (2023) menunjukkan perbedaan antara ayam broiler jantan dan betina dalam hal performa pertumbuhan. Alasan yang mendasari perbedaan ini yaitu mencakup perbedaan dalam daya cerna nutrisi, populasi mikrobiota usus, serta ekspresi gen pengangkut nutrisi. Perbedaan-perbedaan ini berkontribusi pada peningkatan variasi hasil yang diperoleh dari uji coba penelitian berbasis nutrisi.

Komunitas bakteri usus pada unggas terbentuk secara acak dan cukup heterogen karena paparan bakteri dari berbagai faktor lingkungan, bukan kolonisasi oleh bakteri yang diturunkan dari induknya (Stanley *et al.*, 2013). Adapun faktor lingkungan mencakup pola pemeliharaan unggas dan sumber pakan yang diberikan. Sejalan dengan penelitian Gong *et al.* (2008); Xu *et al.* (2016) bahwa akses lingkungan yang luas secara nyata memperkaya *Bifidobacterium* pada saluran pencernaan unggas. Kemudian unggas yang dipelihara dalam sistem peternakan bebas, diamati adanya kelimpahan bakteri yang lebih tinggi terkait dengan fungsi yang terlibat dalam asam amino dan jalur metabolisme glikan. Berdasarkan hal tersebut, akses terhadap wilayah jelajah memiliki pengaruh terhadap komposisi mikrobiota, namun waktu akses terhadap wilayah jelajah mungkin juga menjadi sangat penting. Ketika akses terhadap kisaran tersebut terjadi selama 4 minggu terakhir saja, bukan dari awal periode produksi dan seterusnya, tidak ditemukan perubahan kekayaan mikrobiota usus pada unggas (Gong *et al.*, 2008). Selain itu juga diketahui bahwa pada proses metabolisme sel didukung oleh penyediaan nutrisi yang berasal dari luar sel. Proses yang terkait *uptake* (penyerapan) nutrisi dengan suhu adalah bahwa molekul-molekul yang berukuran besar harus di hidrolisis terlebih diluar sel. Proses ini dikatalisis oleh enzim ekstraseluler yang aktivitasnya juga dipengaruhi oleh suhu. Selain itu ada banyak protein membran dan protein dinding sel yang berperan dalam proses *uptake nutrient* yang secara fungsional juga dipengaruhi oleh suhu terutama terkait dengan stabilitas strukturalnya. Selain itu juga produksi asam laktat antar isolat menunjukkan adanya pola yang bervariasi ketika melihat faktor lingkungan (salah satunya suhu) lainnya yang dapat mempengaruhinya (Subagiyo *et al.*, 2015).

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2024 - Mei 2024 dengan pengambilan sampel itik jantan *Anas domesticus* pada pesisir Desa Tamasaju, Kecamatan Galesong Utara, Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan yang digunakan sebagai sumber bakteri probiotik yang akan dilakukan isolasi dan karakterisasi di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Terpadu, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

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

2.2.2 Bahan

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

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

- A. Sterilisasi dengan metode panas kering dengan suhu 130 °C – 180 °C selama 30 menit. Metode sterilisasi ini digunakan misalnya pada alat-alat gelas, seperti tabung reaksi, beaker glass dan cawan petri. Sterilisasi panas kering memiliki prinsip dasar yaitu melalui mekanisme konduksi, panas akan diabsorpsi oleh permukaan luar dari peralatan yang akan disterilkan, lalu merambat ke bagian lebih dalam dari peralatan. Instrumen yang digunakan pada proses sterilisasi ini yaitu oven (Mansur *et al.*, 2019).
- B. Sterilisasi panas membara yaitu dengan cara jarum ose disterilkan diatas nyala api Bunsen hingga merah membara (Mansur *et al.*, 2019).

- C. Sterilisasi panas basah yaitu dengan menggunakan alat non-instrumen berupa autoklaf pada suhu 121°C dan dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Alat yang menggunakan proses sterilisasi ini yaitu media pertumbuhan bakteri dan alat *non-glass* (Mansur *et al.*, 2019).

2.3.2 Pembuatan Media

A. Pembuatan Media MRSA (*de Mann Rogosa Sharpe Agar*)

Sebanyak 6,2 g media MRSA dan CaCO₃ 1% dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dan dibuat dalam pH 6,2. Selanjutnya larutan dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Setelah itu, larutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan menggunakan aluminium foil pada bagian mulut erlenmeyer. Dilakukan sterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

B. Pembuatan Media MRSB (*de Mann Rogosa Sharpe Broth*)

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

C. Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)

Sebanyak 2,3 g media NA dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dan dibuat dalam pH 7. Selanjutnya larutan dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Setelah itu, larutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan menggunakan aluminium foil pada bagian mulut erlenmeyer. Dilakukan sterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

D. Pembuatan Media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

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

E. Pembuatan Media SIM (*Sulfid Indol Motility*)

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

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

Sebanyak 1,7 g media MR-VP dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dan dibuat dalam pH 6,9. Selanjutnya larutan dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Setelah itu, media dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi yang

masing-masing sebanyak 5 mL. Kemudian, dilakukan sterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.3 Pengambilan Sampel Itik Jantan *Anas domesticus*

Sampel Itik jantan *Anas domesticus* sehat dan tidak dalam keadaan stress diambil dari pesisir di Desa Tamasaju Kecamatan Galesong Utara Kabupaten Takalar. Pengambilan itik Jantan *Anas domesticus* didasarkan pada besarnya zona hambat pada penelitian sebelumnya dan adanya perbedaan karakteristik itik Jantan dan Betina. Sampel kemudian disembelih. Itik yang telah disembelih kemudian diairi dengan air mendidih dan dibersihkan. Sampel itik Jantan *Anas domesticus* kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin untuk dilakukan proses selanjutnya yaitu isolasi dan karakterisasi bakteri probiotik pada sampel tersebut.

2.3.4 Isolasi Bakteri Probiotik

Sampel itik jantan *Anas domesticus* kemudian di bersihkan dan dibelah perutnya untuk diambil bagian ususnya, selanjutnya kotoran bagian dalam usus itik di buang kemudian dibersihkan menggunakan aquades steril. Setelah itu, usus dipotong membujur sehingga menjadi dua bagian. Kemudian usus itik dikerok bagian dindingnya menggunakan skapel steril lalu dimasukkan kedalam larutan NaCl fisiologis steril dan dilakukan pengenceran bertingkat (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7}). Selanjutnya, diinokulasikan pada media MRSA yang ditambahkan CaCO_3 1% untuk setiap 1 mL dari semua tingkat pengenceran ke dalam cawan petri dengan menggunakan metode tuang (*pour plate*). Dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 2x24 jam. Pertumbuhan bakteri asam laktat ditandai dengan zona bening yang terbentuk pada media.

2.3.5 Pemurnian Bakteri Probiotik

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

2.3.6 Pembuatan Stok Isolat Bakteri Probiotik

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

2.3.7. Pengamatan Morfologi Bakteri Probiotik

2.3.7.1. Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri

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

2.3.7.2. Pengamatan Morfologi Sel Bakteri (Pengecatan Gram)

Pengamatan untuk morfologi sel bakteri dilakukan dengan menggunakan teknik pewarnaan Gram. Pertama-tama ulasan bakteri dibuat pada permukaan kaca preparat dan selanjutnya dilakukan proses fiksasi. Kemudian, sebanyak 2-3 tetes Gram A (kristal violet) diteteskan pada ulasan bakteri yang berada pada permukaan kaca preparat dan didiamkan selama 60 detik. Kaca preparat kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu, sebanyak 2-3 tetes Gram B (larutan lugol/JKJ) diteteskan pada ulasan bakteri, didiamkan terlebih dahulu selama 60 detik yang kemudian kaca preparat dicuci dengan menggunakan air mengalir dan dikeringkan.

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

2.3.8. Uji Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik

2.3.8.1. Uji Ketahanan Terhadap Keasaman Lambung (pH)

Uji ketahanan terhadap asam lambung (pH) dilakukan dengan menggunakan media MRSB yang dengan penambahan HCl 0,1 N untuk mendapatkan pH 2,5-3 (sesuai dengan pH lambung). Sebanyak 1 ose pada masing-masing isolat dari stok kultur diinokulasikan pada media MRSB + HCl 0,1 N. Kemudian dilakukan proses inkubasi pada suhu 37 °C selama 2 x 24 jam. Hasil positif pertumbuhan bakteri ditandai dengan endapan yang terbentuk pada tabung reaksi dan warna media yang menjadi keruh pada media MRSB yang telah ditambahkan HCl 0,1 N.

2.3.8.2. Uji Ketahanan Terhadap Garam Empedu

Media MRSB ditambahkan dengan garam sintetik (*ox bile*) dengan konsentrasi 1% dan 5%. kemudian sebanyak 1 ose bakteri isolat yang diambil dari stok kultur diinokulasikan pada media MRSB + garam empedu 1% dan 5%. Dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 2 x 24 jam (Husain *et al.*, 2017). Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan pada tabung reaksi dan warna media

yang berubah menjadi keruh yang dapat diamati pada media MRSB + garam empedu 1% dan 5%.

2.3.8.3 Uji Ketahanan Temperatur (Suhu)

Masing-masing isolat bakteri dari stok kultur diambil sebanyak 1 ose dan dilakukan inokulasi pada media MRSB dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi pada suhu 15 °C, 37 °C dan 45 °C selama 2 x 24 jam. Hasil positif apabila terjadi pertumbuhan bakteri pada media dan hasil negatif apabila tidak terjadi pertumbuhan bakteri pada media. Adanya pertumbuhan ditandai dengan media yang menjadi keruh.

2.3.9 Uji Karakterisasi Biokimia

2.3.9.1 Uji MR (*Methyl-Red*)

Diinokulasikan pada media MR-VP isolat yang diambil dari stok kultur sebanyak 1 ose, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 x 24 jam. Setelah itu, media kemudian ditambahkan 5 tetes *methyl red* pada media. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya kompleks warna merah muda sampai merah yang dapat teramati pada media yang menjadi penanda bahwa mikroba tersebut dapat menghasilkan senyawa berupa asam campuran.

2.3.9.2 Uji VP (*Voges Proskauer*)

Diinokulasikan pada media MR-VP isolat yang diambil dari stok kultur sebanyak 1 ose, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 x 24 jam. Setelah itu, media kemudian ditambahkan 0,2 mL KOH 40% dan 0,6 mL alfa naftol dan dihomogenkan selama 30 detik. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya kompleks warna lembayung pada media.

2.3.9.3 Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Diinokulasikan sebanyak 1 ose isolat bakteri yang diambil dari stok kultur pada media TSIA dengan metode tusuk pada bagian *butt* dan metode gores pada bagian *slant*. Kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam. Adapun perubahan yang dapat teramati setelah dilakukan inkubasi yaitu warna media yang menjadi kuning menandakan asam, sedangkan warna merah pada media yang menandakan media menjadi suasana lebih basa dan warna yang menjadi hitam menandakan terbentuknya H₂S, selain itu yang menandakan jika positif memproduksi gas dapat teramati Ketika media terangkat.

2.3.9.4 Uji Motilitas

Diinokulasikan sebanyak 1 ose setiap isolat bakteri yang diambil dari stok kultur ke dalam media SIM (*Sulfide Indole Motility*) dengan metode di tusuk tegak. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya pola pertumbuhan yang menyebar pada area sekitar tusukan Ketika proses inokulasi

yang menyerupai akar pohon. Hal tersebut menandakan bahwa mikroba pada isolat bakteri melakukan pergerakan (motil). Adapun untuk hasil negatif ditandai tidak adanya pola pertumbuhan yang dapat teramati setelah proses inkubasi pada area sekitar bekas tusukan pada media, sehingga hal tersebut menandakan bahwa mikroba tidak melakukan pergerakan (non motil).

2.3.9.5 Uji Katalase

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

2.3.10 Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri Patogen

2.3.10.1 Penyiapan Bakteri Uji

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

2.3.10.2 Penyiapan Kultur Bakteri Probiotik

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

2.3.10.3 Uji Antibakteri

Pengujian ini menggunakan kultur bakteri probiotik yang di shaker selama 1x24 jam. Kultur bakteri dilakukan sentrifugasi, hingga diperoleh supernatan dan pelet. Sebanyak 1 mL isolat *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan kekeruhan 25% T diinokulasi pada media NA dengan metode tuang (*pour plate*) dan ditunggu hingga memadat. Sementara itu *blank disk* steril direndam kedalam masing-masing supernatan bakteri probiotik isolat dari usus itik Jantan *Anas domesticus* dan ciprofloxacin sebagai kontrol positif selama 10 menit. Kemudian setelah memadat, diletakkan *blank disk* di permukaan medium, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan 48 jam. Diukur diameter hambatan yang terbentuk (mm).

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 *S.aureus* dan *E. coli*.