

SKRIPSI

**IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI PROBIOTIK DARI AYAM BURAS
Gallus domesticus MENGGUNAKAN METODE GEN 16S rRNA**

Disusun dan diajukan oleh

MASYKUR

H041 17 1318



**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI PROBIOTIK DARI AYAM BURAS *Gallus domesticus* MENGGUNAKAN METODE GEN 16S rRNA

Disusun dan diajukan oleh

MASYKUR
H041171318

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin pada tanggal 24 Juni 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



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

Pembimbing Pertama,



Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si
NIP. 196512091990082001

Ketua Departemen,


Dr. Nur Haedar, S.Si., M.Si
NIP. 196801291997022001

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Masykur
NIM : H041171318
Program Studi : Biologi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul Identifikasi Isolat Bakteri Probiotik dari Ayam Buras *Gallus domesticus* Menggunakan Metode Gen 16S rRNA adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila di kemudian hari Skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 24 Juni 2021

Yang Menyatakan



Masykur

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahiim,

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Alhamdulillah *rabbil 'alamin*, segala puji dan Syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, karunia, dan hidayah-nya, sehingga penulis akhirnya dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul Identifikasi Isolat Bakteri Probiotik dari Ayam Buras *Gallus domesticus* Menggunakan Metode Gen 16S rRNA sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan dan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari, bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, keterbatasan yang ada dan demi sempurnanya skripsi ini, penulis sangat membutuhkan dukungan dan sumbangsih pikiran yang berupa kritik dan saran yang bersifat membangun.

Selama proses perwujudan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dan doa yang tulus untuk penulis. Pada kesempatan ini, saya ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada semua pihak yang dengan penuh suka cita memberikan dukungan, semangat, motivasi dan bantuan selama proses pencapaian gelar sarjana. Oleh sebab itu, dengan penuh kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada keluarga besar terkhusus kepada kedua orang tua, Ayahanda Drs. Muslimin dan Ibunda Nur Amalia serta saudara-saudara atas dukungan yang telah diberikan kepada penulis baik moril maupun materil serta kiriman do'a yang selalu dicurahkan kepada penulis. Terima

kasih karena selalu menjadi motivasi dan alasan utama penulis untuk menyelesaikan skripsi ini, semoga ini bisa menjadi salah satu hadiah terindah dari penulis untuk keluarga tercinta.

Kepada Ibu Prof. Dr. Dirayah Rauf Husain, DEA selaku pembimbing utama dan ibu Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si selaku pembimbing pertama, penulis mengucapkan banyak terima kasih atas bimbingan dan arahnya berupa kritik dan saran yang membangun, atas ilmunya serta terus memberi motivasi selama penulis melaksanakan proposal, penelitian, hingga tahap penyusunan skripsi ini. Terima kasih karena telah meluangkan waktu untuk terus memberikan bimbingan dan arahan sehingga skripsi ini dapat selesai pada waktu yang tepat. Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Dwia Aries Tina P., M.A., 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. Nur Haedar M.Si. selaku Ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Penulis mengucapkan terima kasih atas ilmu, masukan, saran dan dukungannya.
4. Bapak Dodi Priosambodo, M.Si. selaku dosen Penasehat Akademik (PA), terima kasih atas motivasi dan bimbingan yang diberikan kepada penulis dari awal studi hingga penyusunan skripsi ini dan Ibu Dr. Irma Andriani, S. Si., M.Si. selaku dosen penguji sidang sarjana, terima kasih atas segala bantuan, saran dan ilmunya.

5. Bapak/Ibu Dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya dengan tulus dan sabar kepada penulis selama proses perkuliahan. Staf pegawai Departemen Biologi yang telah banyak membantu penulis baik dalam menyelesaikan administrasi maupun memberikan dukungan kepada penulis selama ini.
6. Kak Fuad, S. Si., kak Heriadi, S. Si. M. Si. dan kak Rihuh Wardani, S. Si. yang telah banyak membantu selama perkuliahan, penelitian hingga penyusunan skripsi ini. Terima kasih atas segala bimbingan, saran, ilmu dan kebaikannya.
7. Teman-teman seperjuangan Biologi Angkatan 2017, terima kasih atas doa, dukungan, kebersamaan serta bantuan yang diberikan selama perkuliahan.
8. Teman-teman alumni SMA Islam Athirah Bone Angkatan 4 (4lucio), terima kasih atas doa dan dukungannya terkhusus Ahmad Risal dan Ardiansyah, A. Md. T atas bantuan dan doanya selama penyusunan skripsi.
9. Teman-teman Panrita Angkatan 7 Rumah Kepemimpinan Regional Makassar, terima kasih atas doa dan dukungannya.
10. Seluruh pihak yang telah membantu dan memberikan dukungan yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis mengucapkan terima kasih banyak untuk semua pihak yang mendukung dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, semoga tuhan senantiasa melimpahkan rahmat dan melindungi kita semua, Aamiin.

Makassar, 2021

Penulis

ABSTRAK

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang diketahui potensial bersumber dari saluran pencernaan termasuk dari pencernaan ayam buras *Gallus domesticus* dan BAL sebagai golongan yang lebih banyak dijumpai. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi isolat bakteri probiotik yang diperoleh dari saluran pencernaan Ayam Buras *Gallus domesticus* secara molekuler dengan metode PCR dan sekuensing gen berbasis 16S rRNA. Uji daya hambat dilakukan untuk mendapatkan isolat potensial dari tiga isolat bakteri probiotik golongan BAL (isolat R4, R5 dan R6), isolat potensial terpilih kemudian dilakukan pengamatan morfologi koloni, morfologi sel dan uji biokimia. Identifikasi secara molekuler (genotipik) dimulai dari ekstraksi DNA, kemudian diamplifikasi dengan primer universal 16S rRNA (63f dan 1387R) menggunakan PCR, lalu dielektroforesis dan dilakukan sekuensing. Hasil sekuens gen dinalisis untuk pencarian homologi menggunakan program BLAST, sedangkan konstruksi filogenetik menggunakan software MEGA-X dengan penjajaran sekuens gen melalui program ClustalW. Hasil uji daya hambat menunjukkan isolat R6 lebih potensial sebagai antibakteri dengan diameter zona hambat 10.9 mm terhadap *E. coli* (kuat) dan 15 mm terhadap *S. aureus* (sangat kuat). Isolat R6 merupakan bakteri Gram-positif tunggal yang berbentuk batang, warna koloni putih pucat, permukaan koloni halus, elevasi koloni cembung, bentuk koloni melingkar, tepian koloni rata, katalase negatif, non-motil dan heterofermentatif. Hasil amplifikasi menggunakan PCR menunjukkan ampikon 1300 bp dari sekuens DNA gen 16S rRNA dan merupakan bakteri *Lactiplantibacillus plantarum* berdasarkan hasil analisis sekuensnya, sedangkan melalui analisis filogenetik menunjukkan kekerabatan terdekat dengan *Lactiplantibacillus plantarum* strain P92.

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

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that are known to potentially originate from the digestive tract including from the digestion of native chickens *Gallus domesticus* and LAB as the more common groups. The purpose of this study was to identify probiotic bacterial isolate obtained from the digestive tract of Chicken Buras *Gallus domesticus* molecularly with the PCR method and gene sequencing with 16S rRNA-based. Inhibition test was carried out to obtain potential isolate from three isolates of probiotic bacteria (isolate R4, R5 and R6), selected potential isolate were then observed colony morphology, cell morphology and biochemical tests. Molecular identification (genotypic) started with DNA extraction, then amplified with universal primers 16S rRNA (63f and 1387R) using PCR, then electrophoresis and sequencing. The results of the gene sequences were analyzed for homology search using the BLAST program, while the phylogenetic construction used MEGA-X software with the alignment of the gene sequences through the ClustalW program. The results of the inhibition test showed isolate R6 was more potential as antibacterial with an inhibition zone diameter of 10.9 mm against *E. coli* (strong) and 15 mm against *S. aureus* (very strong). Isolate R6 is a single strain Gram-positive bacterium with rod-shaped, pale white colony color, smooth colony surface, convex colony elevation, circular colony shape, flat colony edges, catalase negative, non-motile and heterofermentative. The results of amplification using PCR showed amplicon 1300 bp from the DNA sequence of the 16S rRNA gene and was a bacterium *Lactiplantibacillus plantarum* based on the results of its sequence analysis, whereas through phylogenetic analysis showed the closest relationship with *Lactiplantibacillus plantarum* strain P92.

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

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1 Latar belakang	1
I.2 Tujuan Penelitian.....	3
I.3 Manfaat Penelitian.....	4
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
II.1 Probiotik.....	5
II.2 Manfaat dan Peran Probiotik	6
II.3 Bakteri Probiotik	8
II.4 Bakteri Probiotik dari Saluran Pencernaan Ayam Buras <i>Gallus</i> <i>domesticus</i>	11

II.5 Identifikasi Bakteri.....	13
II.5.1 Karakteristik Morfologi	13
II.5.2 Sifat Biokimia dan Fisiologis.....	14
II.5.3 Identifikasi Molekuler Berbasis Gen 16S rRNA	15
II.6 Tahapan Metode Identifikasi Molekuler Berbasis Gen 16S rRNA	16
II.6.1 Ekstraksi DNA	16
II.6.2 Amplifikasi DNA dengan Metode PCR.....	18
II.6.3 Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis	20
II.6.4 Sekuensing DNA.....	21
II.6.5 Analisis Sekuens DNA	21
BAB III METODE PENELITIAN	23
III.1 Alat	23
III.2 Bahan	23
III.3 Prosedur Penelitian	24
III.3.1 Sterilisasi Alat.....	24
III.3.2 Pembuatan Media	24
III.3.3 Peremajaan Bakteri Probiotik.....	25
III.3.4 Pembuatan <i>Stock</i> Bakteri Probiotik	25
III.3.5 Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri Patogen	25
III.3.6 Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Probiotik.....	26
III.3.7 Pengecatan Gram Bakteri Probiotik	27
III.3.8 Uji Biokimia Pada Bakteri Probiotik.....	27
III.3.9 Ekstraksi DNA.....	28

III.3.10 Amplifikasi DNA dengan Metode PCR	29
III.3.11 Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis.....	30
III.3.12 Sekuensing DNA	30
III.3.13 Analisis Urutan DNA	31
III.4 Analisis Data.....	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	32
IV.1 Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Probiotik Terhadap Bakteri Patogen	32
IV.2 Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Probiotik Isolat R6.....	37
IV.3 Pengamatan Morfologi Sel Bakteri Probiotik Isolat R6.....	38
IV.4 Uji Biokimia	39
IV.4.1 Uji <i>Triple Sugar Iron Agar</i> (TSIA)	39
IV.4.2 Uji Motilitas.....	40
IV.4.3 Uji Katalase	41
IV.5 Analisis Molekuler Berbasis Gen 16S rRNA.....	42
IV.5.1 Ekstraksi DNA.....	42
IV.5.2 Amplifikasi DNA dengan Metode PCR dan Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis	44
IV.5.3 Analisis Sekuens DNA Gen 16S rRNA Bakteri.....	48
IV.5.4 Visualisasi Kekerabatan Melalui Analisis Filogenetik	52
BAB V PENUTUP	54
V.1 Kesimpulan	54
V.2 Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	55

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Pengukuran Zona Hambat pada Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri <i>Escherichia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>	35
2. Morfologi Koloni Bakteri Probiotik Isolat R6	38
3. Hasil Analisis Sekuens DNA Bakteri Probiotik Isolat R6	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Skema Prinsip Kerja PCR	18
2. Hasil Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri Uji (a) <i>Escherichia coli</i> dan (b) <i>Staphylococcus aureus</i>	34
3. Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Probiotik Isolat R6	37
4. Pengamatan Morfologi Sel Bakteri Probiotik Isolat R6	38
5. Hasil Uji TSIA Bakteri Probiotik Isolat R6	39
6. Hasil Uji Motilitas Bakteri Probiotik Isolat R6	40
7. Hasil Uji Katalase Bakteri Probiotik Isolat R6	41
8. Hasil Ekstraksi DNA Bakteri Probiotik Isolat R6	44
9. Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis	47
10. Pohon Filogenetik Berdasarkan Sekuens DNA Pengkode 16S rRNA dari Bakteri Probiotik Isolat R6 dengan Sekuens DNA Pengkode 16S rRNA bakteri Genebank	53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Penelitian.....	63
2. Skema Kerja Peremajaan Isolat Bakteri Probiotik.....	64
3. Skema Kerja Uji Daya Hambat Bakteri.....	65
4. Skema Kerja Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Probiotik	66
5. Skema Kerja Pengecatan Gram Bakteri Probiotik.....	67
6. Skema Kerja Uji Biokimia Bakteri Probiotik	68
7. Skema Kerja Ekstraksi DNA	69
8. Skema Kerja Amplifikasi DNA dengan PCR.....	70
9. Skema Kerja Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis	71
10. Dokumentasi Peremajaan dan Pembuatan Stok Isolat Bakteri Probiotik	72
11. Dokumentasi Uji Daya Hambat Bakteri	73
12. Dokumentasi Pengamatan Morfologi Koloni dan Morfologi Sel Bakteri Probiotik Isolat R6	74
13. Dokumentasi Uji Biokimia Bakteri Probiotik Isolat R6.....	75
14. Dokumentasi Ekstraksi DNA Bakteri Probiotik Isolat R6	76
15. Dokumentasi Amplifikasi DNA dengan PCR	78
16. Dokumentasi Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis.....	79
17. Hasil Analisis Sekuens DNA Isolat R6.....	80
18. Pembuatan Pohon Filogenetik Menggunakan MEGA-X	82

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

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

Sumber bakteri probiotik potensial berasal dari saluran pencernaan manusia maupun hewan. Menurut Fijan (2014), salah satu genus BAL yang paling banyak dijumpai pada saluran pencernaan yaitu *Lactobacillus* baik pada manusia maupun hewan. Ayam buras *Gallus domesticus* merupakan salah satu sumber ditemukannya bakteri probiotik. Berdasarkan penelitian Yulianto dan Lokapirnasari (2018), terdapat tiga BAL yang berhasil diisolasi dari saluran pencernaan ayam kampung meliputi *L. plantarum*, *L. acidophilus* dan *L. casei*. Penelitian lainnya oleh Husain *et al.* (2017) juga memperoleh tujuh isolat bakteri probiotik dari saluran pencernaan ayam buras, dua isolat diantaranya dinilai potensial sebab memiliki pertumbuhan yang stabil dan dapat menghambat bakteri patogen.

Manfaat dan peran probiotik terhadap kesehatan tubuh organisme, yaitu dapat meningkatkan aktivitas enzim pencernaan, menyebabkan peningkatan penyerapan makanan, menghasilkan senyawa antimikroba, meningkatkan pertahanan imun inang terhadap patogen, dan dapat mengurangi risiko berbagai penyakit kronis (Toi dan Van, 2020; Angelin dan Kavitha, 2020; Nazir *et al.*, 2018). Probiotik memiliki peran penting dalam menjaga kesehatan tubuh manusia (Nazir *et al.*, 2018). Selain itu, probiotik banyak dimanfaatkan dalam bidang perikanan seperti pada budidaya udang dan juga di bidang peternakan seperti pada ternak ayam broiler dalam meningkatkan kualitas panennya (Van, 2020; Husain *et al.*, 2017). Besarnya manfaat dan peran probiotik bagi kesehatan tubuh organisme sehingga banyak penelitian yang dilakukan dalam mengisolasi probiotik dari saluran pencernaan manusia ataupun hewan, salah satunya dari ayam buras *Gallus domesticus* sebagai sumber bakteri probiotik potensial. Bakteri probiotik yang diisolasi selanjutnya perlu diidentifikasi untuk mengetahui jenis dan strainnya serta kekerabatannya sebagai dasar untuk mengetahui potensinya, yaitu potensi dalam modulasi kekebalan pada saluran pencernaan dan produksi zat seperti asam organik atau bakteriosin (De Giani *et al.*, 2019; Husain *et al.*, 2020). Melalui potensi tersebut sehingga bakteri probiotik yang telah diketahui identitasnya dapat diterapkan lebih luas dalam bidang kesehatan, farmasi, peternakan, perikanan ataupun penelitian-penelitian lanjutan lainnya.

Identifikasi bakteri merupakan langkah untuk menemukan dan mengetahui strain bakteri probiotik yang diisolasi dari sumbernya. Secara konvensional, identifikasi dilakukan secara fisiologis dan biokimia (Gulaydin *et*

al., 2019). Seiring berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi, berbagai bidang penelitian dalam melakukan identifikasi bakteri telah memanfaatkan metode deteksi molekuler. Metode deteksi molekuler berbasis genetik terbukti sangat akurat dengan penggunaan yang luas dan spesifisitas yang tinggi serta dapat dijadikan arahan dalam mengetahui potensi suatu bakteri dari urutan gennya (Suardana, 2014; Osman *et al.*, 2020). Metode ini diawali dengan isolasi DNA dari isolat bakteri, kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi gen menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan menggunakan primer universal gen 16S rRNA. Pemanfaatan gen 16S rRNA dinilai memiliki keakuratan yang tinggi, bersifat terkonservasi dan bersifat ubikuitas dengan fungsi yang bersifat identik pada organisme (Suardana, 2014). Setelah amplifikasi PCR, dilanjutkan dengan visualisasi pada elektroforesis yang menunjukkan hasil amplifikasi primer pada ukuran tertentu dari DNA isolat bakteri. Selanjutnya, analisis fragmen gen dengan sekuensing, kemudian hasil sekuensing dianalisis dengan program BLAST di situs NCBI untuk mengetahui nama spesies dari isolat bakteri tersebut.

Berdasarkan uraian diatas, maka telah dilakukan penelitian yang mengidentifikasi isolat bakteri probiotik yang terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi Universitas Hasanuddin yang diisolasi dari ayam buras *Gallus domesticus* secara molekuler berbasis gen 16S rRNA.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi isolat bakteri probiotik secara molekuler dengan metode PCR dan sekuensing gen berbasis 16S rRNA.

I.3 Manfaat penelitian

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

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2020-Maret 2021. Penyiapan sediaan probiotik dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi dan preparasi DNA sampel dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains, Science Building, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Probiotik

Probiotik berasal dari bahasa Latin (*pro*) dan Yunani (*bios*) yang secara harfiah berarti "*for life*" (Gogineni *et al.*, 2013). Probiotik dalam hal ini merupakan organisme hidup yang berukuran kecil (mikroorganisme), bersel tunggal, yang bermanfaat bagi kesehatan pencernaan. Probiotik bukanlah antibiotik, bahan kimia, atau zat buatan, melainkan organisme hidup yang pertama kali ditemukan pada manusia dan kemudian diuji kemampuannya untuk melawan atau mencegah penyakit. Probiotik tersedia dalam bentuk kapsul, tablet, atau berbagai produk makanan. Umumnya probiotik adalah bakteri atau ragi. Ada beragam jenis probiotik yang berbeda, tetapi sebagian besar adalah bakteri dari genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* dan *Escheria* atau ragi dari genus *Saccharomyces* (Elmer, 2012).

Sejarah probiotik dimulai pada tahun 1680 dimana van Leeuwenhoeck menggunakan mikroskop yang baru dibuatnya untuk mengamati sel ragi dalam bir fermentasi, namun terkait hubungan antara keberadaan sel ragi ini dan proses fermentasi tidak dijelaskan. Tahun 1899, Henry Tissier mengisolasi *Bifidobacteria* dari kotoran bayi yang diberikan pada ASI dan menemukan bahwa *Bifidobacteria* adalah komponen utama dari flora usus pada manusia sehat, kemudian merekomendasikan pemberian *Bifidobacteria* pada bayi yang mengalami diare. Pada tahun 1930, ketika ahli mikrobiologi Jepang Minoru Shirota pertama kali menemukan flora bakteri yang bertahan melewati usus.

Shirota dapat mengisolasi dan mengkultur bakteri tersebut yang kemudian hingga sekarang dikenal sebagai *Lactobacillus casei* strain *shirota* yang komersial sebagai Yakult. Istilah probiotik pertama kali digunakan oleh Kollath pada tahun 1953 untuk secara umum menggambarkan berbagai suplemen organik dan anorganik yang diyakini memiliki kemampuan untuk memulihkan kesehatan pasien yang kekurangan gizi. Pada tahun 1906, produk susu fermentasi yang mengandung *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus delbruekii* mulai dipasarkan. Pada tahun 1919, Isaac Carasso juga memulai produksi yoghurt komersial di Spanyol. Susu fermentasi Yakult sebagai probiotik pertama yang tersedia secara komersial dan dilanjutkan oleh Yoghurt, kemudian perkembangan berbagai produk probiotik serta aplikasinya terus meningkat seiring waktu (Gogineni *et al.*, 2013).

II.2 Manfaat dan Peran Probiotik

Probiotik memiliki aktivitas antimikroba yang kuat serta antagonisme terhadap bakteri patogen. Aktivitas antagonis dari satu mikroorganisme terhadap mikroorganisme lainnya dapat disebabkan oleh adanya kompetitif, modulasi imun, stimulasi sistem pertahanan tubuh, produksi asam organik atau hidrogen peroksida yang menurunkan pH, produksi antimikroba seperti bakteriosin, antioksidan, produksi molekul pemberi sinyal yang memicu perubahan ekspresi gen. Zat antimikroba yang bermanfaat yang dihasilkan mikroorganisme diketahui meliputi asam laktat, asam asetat, asam format, asam fenilaktat, asam benzoid serta asam organik lainnya, asam lemak rantai pendek, hidrogen peroksida, karbon dioksida, asetaldehida, asetoin, diasetil, bakteriosin dan zat penghambat

lainnya. Bakteriosin yang paling umum termasuk lacin, lactocin, pediocin, pisciolin, enterocin, reuterin, plantaricin, enterolysin dan nisin (Fijan, 2016).

Probiotik bersama dengan mikroba menguntungkan lainnya merupakan mikroba komensal usus dan berbeda dari bakteri patogen dalam hal ini memiliki peran pada kekebalan sel di usus karena tidak dapat memicu proliferasi sel mononuklear atau aksi inflamasi. Selain itu, probiotik memiliki beberapa karakteristik penting yang meliputi (Fijan, 2016):

1. aman terhadap tubuh
2. toleransi terhadap asam untuk pertahanan hidupnya dalam tubuh dari rongga mulut ke usus kecil, tempat di mana probiotik hidup
3. memiliki kemampuan untuk melekat pada lendir dan/atau sel epitel serta permukaan saluran pencernaan lainnya
4. rentan terhadap antibiotik
5. menunjukkan aktivitas antimikroba dalam melawan patogen

Selain dapat mencegah dan memperbaiki penyakit usus dengan meningkatkan sistem kekebalan tubuh sebagai salah satu efek utama kesehatan probiotik. Probiotik juga ditemukan menunjukkan efek hipokolesterolemik melalui asimilasi kolesterol, pengikatan kolesterol ke permukaan sel, pengendapan bersama kolesterol, mengganggu pembentukan misel untuk penyerapan usus, dekonjugasi asam empedu, dan memperbaiki profil lipid. Selain itu, probiotik juga dapat digunakan untuk mencegah dan mengobati penyakit mulut dengan memperbaiki/ mencegah karies gigi dan infeksi periodontal melalui penghambatan pertumbuhan bakteri kariogenik dan periodontopatogen (Shi *et al.*, 2016).

Probiotik tak hanya potensial diterapkan pada manusia, namun juga dapat diterapkan pada hewan. Saat ini, banyak penelitian dan aplikasi probiotik pada bidang perikanan dan peternakan. Aplikasi probiotik pada sektor perikanan, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Van (2020) yaitu pada budidaya udang menunjukkan hasil budidaya yang terbaik dengan pertumbuhan dan kelangsungan hidup udang yang tinggi. Pada bidang peternakan, pemberian probiotik pada makanan ayam pedaging (broiler) mampu meningkatkan pertambahan bobot badan dan kualitas daging ayam broiler, sebab probiotik mampu meningkatkan perbaikan tubuh dengan meningkatkan daya cerna dan penyerapan nutrisi di saluran pencernaan (Husain *et al.*, 2017).

II.3 Bakteri Probiotik

Probiotik umumnya berupa bakteri dan juga *yeast*, namun golongan bakteri diketahui lebih potensial dibandingkan dengan ragi. Ragi dalam produk probiotik secara komersial terbatas pada satu strain yaitu *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii*, sedangkan bakteri meliputi kelompok Bakteri Asam Laktat (BAL) yang dapat dimasukkan pada produk susu atau makanan lainnya dan bakteri *non*-BAL seperti *Bacillus*, *Propionibacterium*, dan *Escherichia coli* yang biasanya digunakan sebagai sediaan farmasi yang dienkapsulasi. BAL dianggap memiliki catatan keamanan yang sangat baik sehingga paling banyak dimanfaatkan. Genera *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* yang berasal dari saluran pencernaan memiliki frekuensi tinggi dalam pengaplikasiannya sebagai probiotik dan diketahui tidak ada indikasi nyata mengenai produksi senyawa berbahaya dari genus tersebut (Huys *et al.*, 2013). BAL dicirikan sebagai bakteri Gram-positif, tidak membentuk spora, sel berbentuk batang dan kokus,

aerotolerant, toleran asam dan katalase negatif tanpa sitokrom serta menghasilkan asam laktat sebagai salah satu produk fermentasi utama dengan memanfaatkan karbohidrat selama fermentasi (Gupta *et al.*, 2018).

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

1. Bakteri Asam Laktat

a. *Lactobacillus*

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

b. *Enterococcus*

Enterococcus adalah bakteri Gram-positif dalam kelompok bakteri asam laktat. Beberapa strain *Enterococcus* mengerahkan disbiosis yang

diinduksi oleh antibiotik dan bertindak sebagai antitumor atau agen antikanker dan memodulasi sistem kekebalan tubuh. Kultur strain *E. faecium* dari epitel usus manusia meningkatkan efek bakterisidal terhadap *E. coli* enteroaggregative, kerusakan membran, dan lisis sel (Azad *et al.*, 2018).

c. Bakteri asam laktat lainnya

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

2. *Bifidobacterium*

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

3. Spesies Bakteri Lainnya

Escherichia coli merupakan bakteri Gram-negatif dalam kelompok Enterobacteriaceae dan termasuk strain probiotik terkenal dengan beberapa efek menguntungkan pada homeostasis mikrobiota usus. Galur nonpatogenik *Escherichia coli* Nissle (EcN) adalah salah satu galur probiotik yang paling banyak digunakan dalam homeostasis mikrobiota usus. EcN dapat merangsang produksi β -defensin 2 manusia, yang dapat melindungi penghalang mukosa terhadap adhesi dan invasi oleh komensal patogen (Azad *et al.*, 2018). Jenis-jenis bakteri lainnya yang terpenting sebagai probiotik diantaranya *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Pr. freudenreichii* subsp. *shermanii* dan *Pr. jensenii* (Huys *et al.*, 2013).

II.4 Bakteri Probiotik dari Saluran Pencernaan Ayam Buras *Gallus domesticus*

Probiotik diketahui pasti berasal dari manusia, namun banyak peneliti telah menemukan bahwa beberapa strain yang tidak diisolasi dari manusia melainkan dari hewan telah terbukti lebih efektif dengan efek antimikroba terhadap patogen dengan mempertahankan homeostasis flora usus (Fijan, 2016). Salah satu sumber probiotik potensial yang berasal dari hewan yaitu dari saluran pencernaan ayam buras *Gallus domesticus* (Yulianto & Lokapirnasari, 2018; Husain *et al.*, 2020). Sumber bakteri asam laktat yang potensial dapat berasal dari ayam peliharaan yang dipelihara di luar ruangan karena habitatnya di alam bebas memungkinkan tingginya keanekaragaman hayati bakteri di saluran pencernaannya (Husain *et al.*, 2020).

Mikrobiota dalam saluran pencernaan ayam memiliki potensi metabolisme yang luas dalam mempengaruhi nutrisi dan kesehatan inang. Komunitas mikroba ini, secara kolektif disebut sebagai mikrobiomassa yang memainkan peran penting dalam pertumbuhan dan perkembangan saluran pencernaan ayam, termasuk produksi asam lemak rantai pendek yang kaya energi, peningkatan morfologi vilus dari saluran pencernaan ayam; penggunaan nutrisi, pengurangan viskositas luminal, dekonstruksi polisakarida pakan, penyerapan nutrisi, dan detoksifikasi. Selain itu, mikrobiota memberikan pertahanan terhadap patogen enterik yang tidak menguntungkan melalui beberapa mekanisme yang diketahui yaitu, kompetitif secara eksklusif, antagonisme bakteri dan resistensi kolonisasi. Secara khusus, mekanisme di mana bakteri usus dapat menghambat patogen termasuk persaingan untuk mendapatkan nutrisi, persaingan untuk tempat kolonisasi, atau stimulasi sistem kekebalan. (Yulianto & Lokapirnasari, 2018).

Beberapa bakteri yang ditemukan pada saluran pencernaan ayam diantaranya yaitu, *L. plantarum*, *L. acidophilus* dan *L. casei* pada bagian esofagus; *L. plantarum* dan *L. casei* dari bagian proventrikulus; dan *L. plantarum*, *L. acidophilus* dan *L. casei* dari ventrikulus (Yulianto & Lokapirnasari, 2018). Pada bagian dinding dalam usus ditemukan *Bacillus subtilis* (Husain *et al.*, 2020). Sedangkan pada ileal dan cecal ditemukan *Lactobacillus salivarius*, *L. aviarius*, *L. crispatus*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *E. coli*, *Gallibacterium anatis*, *Clostridium lactatifermentans*, *Ruminococcus torques*, *Bacteroides vulgatus*, dan *Alistipes finegoldii*. Lokasi kolonisasi oleh strain probiotik dapat mempengaruhi kinerjanya pada ayam (Oakley *et al.*, 2014).

II.5 Identifikasi Bakteri

Identifikasi adalah menentukan identitas suatu isolat dengan mencocokkan karakteristiknya dengan spesies yang telah diidentifikasi sebelumnya. Kadang-kadang, properti dari sebuah isolat tidak dapat dicocokkan; ini bisa mengarah pada penemuan spesies baru. Jika ditelusuri lebih lanjut, peneliti harus mendefinisikan kelompok taksonomi isolat yang tidak cocok ini dan menetapkan nama ilmiahnya sesuai dengan aturan internasional.

Identifikasi bakteri memerlukan pengetahuan terkait karakteristik morfologi, biokimia, fisiologis, dan genetiknya. Ciri-ciri tersebut dapat dikelompokkan menjadi fenotipik dan genotipik (Zourob *et al.*, 2008). Identifikasi bakteri yang dilakukan secara fenotipik memiliki kekurangan, yaitu metode tersebut memiliki keakuratan yang dinilai rendah, membutuhkan waktu yang lama dan biaya yang tinggi sehingga diperlukan metode alternatif secara genotipik. Identifikasi bakteri secara genotipik memanfaatkan metode deteksi molekuler yang dinilai memiliki keakuratan yang tinggi dengan penggunaan yang luas dan dapat dijadikan arahan dalam mengetahui potensi suatu bakteri dari urutan gennya (Suardana, 2014). Secara prosedural, identifikasi disarankan untuk dimulai dengan kategorisasi yang luas secara fenotipik (misalnya pewarnaan Gram) dan dilanjutkan ke pengujian yang lebih spesifik secara genotipik yang mengarah pada penentuan genus dan spesies isolat (Zourob *et al.*, 2008).

II.5.1 Karakteristik Morfologi

Morfologi koloni bakteri meliputi bentuk koloni, dimensi, pigmentasi, dan lain-lain. Morfologi sel, seperti yang diamati di bawah mikroskop, termasuk reaksi Gram (positif atau negatif), bentuk (misalnya, coccus atau batang),

pengorganisasian (misalnya, tunggal atau rantai), keberadaan dan sifat endospora (misalnya, sentral atau terminal), flagelasi (mis., kutub atau peritrichous), dan lainnya. Tidak seperti eukariota, bakteri memiliki sifat morfologi sederhana yang tidak dapat diandalkan sebagai alat untuk mengklasifikasikan organisme tersebut. Meskipun isolat bakteri tidak dapat diidentifikasi hanya berdasarkan karakteristik morfologisnya, mengungkapkan ciri-ciri ini dapat memandu analisis dalam mengembangkan skema identifikasi yang baik (Zourob *et al.*, 2008).

II.5.2 Sifat Biokimia dan Fisiologis

Sejumlah besar karakteristik biokimia dan fisiologis telah digunakan dalam identifikasi bakteri. Hasil tes ini dapat digunakan dalam identifikasi bakteri berdasarkan taksonomi numerik. Identifikasi isolat bakteri mungkin memerlukan 100-200 pengujian dan algoritme yang tepat untuk menganalisis data ini dan memprediksi identitas isolat (Zourob *et al.*, 2008).

Sifat biokimia dan fisiologis dapat dikelompokkan sebagai berikut (Zourob *et al.*, 2008):

- a. Reaksi biokimia yang cepat. Ini menunjukkan adanya enzim tunggal atau kompleks enzim. Reaksi yang dikatalisis oleh enzim permukaan atau ekstraseluler dapat dianalisis dengan mudah dan cepat. Reaksi lain mungkin memerlukan inkubasi isolat dengan substrat enzim selama beberapa jam. Mewakili kategori ini adalah reaksi yang dikatalisis oleh katalase, oksidase, nitrat reduktase, amilase, β -galaktosidase, termonuklease, dan urease.
- b. Fermentasi karbohidrat. Analisis yang dapat menguji kemampuan isolat dalam memanfaatkan karbohidrat tertentu sebagai satu-satunya sumber karbon. Profil pemanfaatan karbohidrat dapat berguna dalam mengidentifikasi isolat bakteri.

Fermentasi glukosa, sorbitol, dan manitol adalah contoh pengujian dalam kategori ini.

- c. Gambaran fisiologis lain-lain. Pertumbuhan pada suhu yang berbeda, nilai pH, konsentrasi garam, dan lingkungan gas adalah beberapa sifat fisiologis yang digunakan dalam mengidentifikasi bakteri. Isolat juga dapat diuji untuk pertumbuhan dengan adanya berbagai zat antimikroba (misalnya, antibiotik).

II.5.3 Identifikasi Molekuler Berbasis Gen 16S rRNA

Identifikasi bakteri berbasis urutan nukleotida saat ini merupakan pendekatan yang paling dapat diandalkan. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) memiliki aplikasi yang luas baik di laboratorium diagnostik dan penelitian yang secara rutin digunakan dalam diagnosis dan identifikasi bakteri. Identifikasi bakteri secara molekuler berbasis gen 16S rRNA digunakan secara lebih luas dan merupakan alat (primer universal) yang berguna untuk identifikasi bakteri yang sulit diidentifikasi dengan uji biokimia. Sekuens gen 16S rRNA telah digunakan secara ekstensif untuk mempelajari evolusi dan filogeni bakteri. Sejumlah besar informasi urutan gen 16S rRNA tersedia di *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) dan *Ribosomal Database Project* (RDP), sekuens gen 16S rRNA adalah alat penting dalam sistematika bakteri dan identifikasi spesies baru (Buller, 2004).

Gen 16S ribosomal RNA (16S rRNA) merupakan bagian yang dimiliki oleh prokariot yang bersifat terkonservasi sehingga tepat digunakan sebagai primer universal dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan dapat ditentukan urutan nukleotidanya melalui sekuensing yang kemudian dianalisis untuk menentukan taksonomi dari bakteri tersebut. Selain itu, fungsi gen 16S rRNA dari

waktu ke waktu tidak berubah sesuai jarak evolusinya sehingga keterkaitan evolusi antar spesies dapat diketahui, memiliki bagian *hyper variable region* untuk memudahkan dalam identifikasi bakteri, bersifat ubikuitas dengan fungsi yang bersifat identik pada setiap organisme sehingga mampu membedakan berbagai spesies bakteri, dan gen 16S rRNA (1.500 bp) cukup besar untuk tujuan informatika (Suardana, 2014).

Analisis urutan gen penyandi 16S rRNA ini menjadi tulang punggung klasifikasi filogenetik bakteri. Primer universal untuk gen yang dilestarikan ini dapat digunakan untuk memperkuat urutan suatu gen dari organisme yang ingin diidentifikasi. Untuk mengidentifikasi suatu isolat, urutan nukleotida gen 16S rRNA dicocokkan dengan urutan yang diketahui dalam *database* genom yang tersedia secara luas (misalnya, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Strain yang memiliki kesamaan < 97% dalam urutan gen 16S rRNA mewakili spesies yang berbeda. Lebih lanjut, galur dengan kemiripan $\geq 97\%$ dalam sekuens gen ini memungkinkan spesies yang sama; dalam hal ini, keterkaitan DNA harus dinilai sebelum membuat penentuan akhir (Zourob *et al.*, 2008).

II.6 Tahapan Metode Identifikasi Molekuler Berbasis Gen 16S rRNA

II.6.1 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dari mikroorganisme, terutama bakteri, menjadi metode penting hampir pada semua penelitian mikrobiologi modern. Ekstraksi atau pemurnian DNA genom dari kultur bakteri sebagai dasar dilakukannya analisis molekuler, dan proses ini dapat dilakukan dengan menggunakan kit yang tersedia secara komersial (Wright *et al.*, 2017).

Beberapa reagen yang diperlukan dan digunakan dalam ekstraksi DNA, diantaranya (Wright *et al.*, 2017):

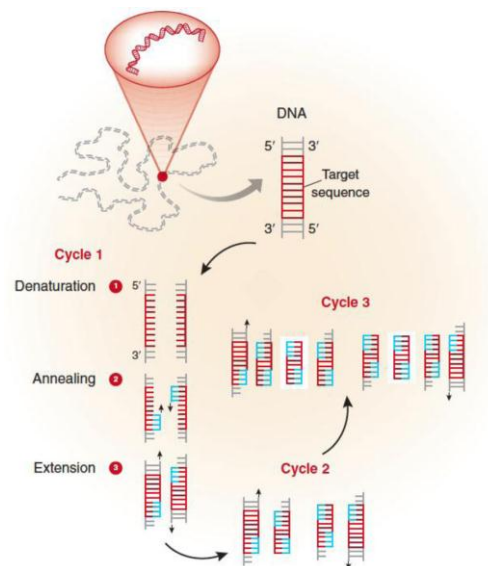
1. RNase, dengan konsentrasi 100 µg/mL. RNase berperan dalam mendegradasi RNA untai tunggal dengan Buffer P1, buffer resuspensi yang terdiri dari 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA.
2. Achromopeptidase, dengan konsentrasi 50 kU/mL. Achromopeptidase merupakan enzim lisis dengan aktivitas bakteriolitik yang kuat terhadap dinding sel bakteri Gram-positif.
3. Lysozyme, dengan konsentrasi 24000 kU/mL. Lysozyme merupakan enzim lisis dengan aktivitas bakteriolitik yang kuat terhadap dinding sel bakteri Gram-negatif.
4. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), dengan konsentrasi 10%. SDS berperan dalam solubilisasi lipid pada membran sel.
5. Proteinase K, dengan konsentrasi 20 mg/mL. Proteinase K berperan dalam digesti protein.
6. Larutan Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (PCL), dengan rasio 25: 24: 1. PCL berperan dalam separasi DNA dari komponen seluler lainnya.
7. Ethanol, dengan konsentrasi 100%. Ethanol berperan dalam presipitasi DNA dari larutan.
8. Tris-EDTA (TE) Buffer, yang terdiri dari 10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA. Larutan buffer/ penyangga digunakan untuk menyimpan DNA murni (purifikasi).

Efisiensi ekstraksi DNA dari filtrasi dan ekstraksi/pemurnian DNA penting jika kuantifikasi yang dibutuhkan benar. Efisiensi ekstraksi DNA dapat

bervariasi tergantung pada matriks air, filter yang digunakan untuk ekstraksi, buffer lisis, kit ekstraksi yang digunakan dan jumlah sel (Sadowsky dan Whitman, 2011).

II.6.2 Amplifikasi DNA dengan Metode PCR

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah metode sintesis enzimatik secara *in vitro* dan amplifikasi fragmen DNA tertentu. Pada tahun 1985, American Karray dan ilmuwan lainnya memelopori teknologi PCR, dan dikembangkan oleh perusahaan Cetus Amerika Serikat. Dengan perkembangan dan terobosan ilmu pengetahuan dan teknologi, teknologi PCR telah banyak digunakan di berbagai bidang, seperti deteksi mikroba, kedokteran hewan, budidaya dan lain sebagainya. Teknik ini memiliki sensitivitas, akurasi dan spesifisitas yang kuat, serta dapat dideteksi dengan cepat, sehingga bidang aplikasinya terus meluas (Yu *et al.*, 2017).



Gambar 1. Skema Prinsip Kerja PCR (Garibyan dan Avashia, 2013)

Teknologi PCR didasarkan pada urutan DNA yang diamplifikasi dengan DNA sintetis yang memiliki dua ujung rantai yang melengkapi dua primer

oligonukleotida. Secara *in vitro* deteksi urutan DNA (*template*) diamplifikasi dalam aksi enzimatis. Keseluruhan proses PCR berlangsung dengan beberapa siklus, satu siklus terdiri dari 3 langkah: langkah pertama adalah denaturasi *template* DNA secara terus menerus dalam kondisi suhu yang tinggi, yaitu pada suhu 93-94°C selama 5 menit dalam kondisi rantai terdenaturasi; langkah kedua adalah *annealing* 2 primer oligonukleotida sintetis dengan rantai DNA cetakan pada suhu 55°C selama 1 menit; langkah ketiga adalah perpanjangan/ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit yang diikuti dengan elongasi akhir selama 5 menit., dengan 4 jenis substrat dNTP. Pada tahap perpanjangan, rantai primer sepanjang arah 5'-3' membentuk rantai baru secara komplementer dengan DNA *template* dengan menggunakan DNA Taq polimerase. Setelah siklus ini, rantai baru disintesis dan dapat dilanjutkan sebagai cetakan DNA yang bisa didaur ulang. Selama siklus, jumlah produk yang diamplifikasi meningkat secara eksponensial, dan siklus salinan gen tunggal bisa mencapai 25-30 kali (Suardana, 2014; Yu *et al.*, 2017). Langkah-langkah reaksi PCR sederhana, tetapi operasi spesifiknya rumit, seperti penentuan suhu penempelan, ekstensi, dan jumlah siklus.

Ada banyak keuntungan dari penggunaan PCR. Pertama, sebagai teknik yang sederhana untuk dipahami dan digunakan, dan menghasilkan hasil dengan cepat. Kedua, teknik ini sangat sensitif dengan potensi menghasilkan jutaan hingga miliaran salinan produk tertentu untuk pengurutan, kloning, dan analisis. Meskipun PCR memiliki kelebihan dan sangat penting akan hasil yang didapatkan dari penggunaannya, namun PCR memiliki keterbatasan. Karena PCR adalah teknik yang sangat sensitif, segala bentuk kontaminasi sampel dengan

jumlah jejak DNA yang sama dapat menghasilkan hasil yang keliru. Selain itu, dalam mendesain primer untuk PCR diperlukan beberapa data sekuens sebelumnya. Oleh karena itu, PCR hanya dapat digunakan untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya patogen atau gen yang diketahui. Batasan lain adalah bahwa primer yang digunakan untuk PCR dapat menempel secara non spesifik ke urutan yang serupa, tetapi tidak sepenuhnya identik dengan DNA target. Selain itu, nukleotida yang salah dapat dimasukkan ke dalam urutan PCR oleh DNA polimerase, meskipun dengan kecepatan yang sangat rendah (Garibyan dan Avashia, 2013).

II.6.3 Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis

Ada dua metode utama yang digunakan untuk memvisualisasikan produk PCR: (1) pewarnaan produk DNA yang diperkuat dengan pewarna kimia seperti etidium bromida, yang menginterkalasi antara dua untai dupleks atau (2) memberi label pada primer PCR atau nukleotida dengan pewarna fluoresen (fluorofor) sebelum amplifikasi PCR. Metode terakhir memungkinkan label untuk langsung dimasukkan ke dalam produk PCR. Metode yang paling banyak digunakan untuk menganalisis produk PCR adalah penggunaan elektroforesis gel agarosa, yang memisahkan produk DNA berdasarkan ukuran dan muatan. Elektroforesis gel agarose adalah metode termudah untuk memvisualisasikan dan menganalisis produk PCR. Ini memungkinkan untuk penentuan keberadaan dan ukuran produk PCR. Satu set produk DNA yang telah ditentukan sebelumnya dengan ukuran yang diketahui dijalankan secara bersamaan pada gel sebagai penanda molekuler standar untuk membantu menentukan ukuran produk (Garibyan dan Avashia, 2013).

II.6.4 Sekuensing DNA

Sekuensing DNA dimulai pada 1970-an ketika virus Lambda (50.000 nukleotida) diurutkan oleh Sanger dan koleganya. Pada waktu itu sekuensing DNA dilakukan untuk genom kecil seperti virus dan organel, dan sekuensing lengkap bakteri tidak dapat dilakukan karena keterbatasan ekonomi dan teknis. Namun, kemudian sekuensing genom manusia berhasil dilakukan, dan peningkatan teknologi sekuensing memfasilitasi sekuensing genom bakteri secara keseluruhan. Bakteri pertama yang diurutkan adalah *Haemophilus influenzae*, dan ini dilakukan dengan metode *shot gun* yang dikembangkan oleh Sanger dan koleganya. Secara singkat, metode sekuensing *shot gun* terdiri dari pengambilan sampel secara acak dan menentukan 500-700 nukleotida yang dibaca dan kemudian menyusunnya untuk merekonstruksi urutan sampel. Karena proses perakitan didasarkan pada penemuan wilayah yang tumpang tindih, lebih dari 1 juta basa harus diurutkan untuk mengurutkan genom. Nilai rata-rata dari setiap basis diurutkan dalam proyek genom. Metode sekuensing yang dikembangkan oleh Sanger dianggap sebagai standar, dan selama bertahun-tahun, sekuensing genom keseluruhan dari banyak bakteri telah dilakukan menggunakan metode ini (Donkor, 2013).

II.6.5 Analisis Sekuens DNA

Setelah genom bakteri diurutkan, hal berikutnya adalah membuat anotasi. Anotasi adalah suatu proses di mana informasi struktural, fungsional, dan informasi biologis lainnya disimpulkan dari gen atau protein, dan ini didasarkan pada kemiripan dengan urutan yang dikarakterisasi sebelumnya dalam data base publik dan memerlukan analisis bioinformatika. Alat bioinformatika seperti

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang dapat diakses melalui (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>) telah ditemukan sangat berguna. Langkah pertama dalam proses anotasi adalah identifikasi urutan pengkodean protein yang diprediksikan, yang umumnya disebut kerangka baca terbuka. Tidak seperti genom eukariotik, identifikasi kerangka pembacaan terbuka pada genom bakteri dan prokariotik lainnya sangat akurat dan juga lebih mudah karena tidak adanya intron dan juga kepadatan gen yang tinggi yang dimiliki oleh organisme ini. Hanya sebagian dari semua kerangka pembacaan terbuka dalam urutan genom yang benar-benar mengkodekan protein, dan prediksi fungsinya dengan perbandingan basis data dengan gen serupa dari fungsi yang diketahui merupakan tahap selanjutnya dalam proses anotasi (Donkor, 2013).

Informasi tentang berbagai sekuens gen organisme termasuk strain yang telah diurutkan dan dijelaskan secara lengkap dilaporkan di situs web Sanger Institute atau *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) melalui alat BLAST. Setelah genom diurutkan dan beranotasi, telah diperoleh informasi dasar untuk memahami kondisi biologi suatu organisme, dan selanjutnya adalah memanfaatkan data genom (Donkor, 2013).

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