

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kesadaran masyarakat terhadap kesehatan termasuk dalam hal konsumsi makanan maupun minuman semakin meningkat membuat masyarakat sadar akan pentingnya kesehatan dengan mempertimbangkan beberapa hal seperti gizi, selera, dan memandang akan manfaat fungsional bagi kesehatan. Salah satu produk yang dapat memberikan manfaat bagi kesehatan adalah produk yang mengandung mikroba hidup atau yang biasa disebut dengan probiotik. Probiotik sering kali dapat ditemukan dalam produk berbasis susu, seperti yogurt dan kefir, yang didalamnya terkandung bakteri asam laktat (BAL). Susu kerbau merupakan salah satu sumber protein hewani yang bernilai tinggi, memiliki potensi sebagai sumber probiotik alami, terutama bakteri asam laktat yang dapat bermanfaat bagi kesehatan. Susu kerbau, dengan komposisi nutrisi yang lebih tinggi, memiliki kandungan protein, lemak, dan mineral yang berpotensi dalam mendukung pertumbuhan BAL yang bermanfaat. Mikroba merupakan organisme tidak tampak kasat mata yang memiliki peran penting dalam siklus energi dan makanan sebagai suatu organisme pengurai. Mikroba dapat bersifat baik atau yang menguntungkan baik untuk kesehatan dan mikroba patogen atau pencemar yang memberikan dampak negatif bagi makhluk hidup lain atau lingkungan (Zulaika *et al.*, 2022).

Bakteri yang menguntungkan dapat digunakan untuk mensejahterakan kehidupan makhluk hidup contohnya dalam bidang pangan, dalam bidang kesehatan sebagai pengurai makanan pada usus besar manusia, dan dalam bidang lingkungan sebagai pengurai senyawa-senyawa organik. Bakteri yang bersifat menguntungkan bagi kesehatan diduga karena adanya peran dari bakteri probiotik (Gracela *et al.*, 2022). Probiotik terdiri dari kata “pro” dan “bios” dalam bahasa Yunani yang memiliki arti “untuk kehidupan”. Definisi probiotik pertama kali didefinisikan oleh Parker tahun 1974 yaitu organisme atau substansi yang mempengaruhi pertumbuhan dan keberlangsungan hidup mikroba di usus. Menurut FAO/WHO probiotik adalah mikroorganisme hidup yang bermanfaat untuk kesehatan jika diberikan sesuai dosis dan jumlah yang tepat. Penelitian mengenai probiotik telah menunjukkan bahwa bakteri ini dapat bermanfaat bagi kesehatan manusia di sejumlah bidang seperti antimikroba, pengobatan diare, intoleransi laktosa, kekebalan tubuh, pengobatan maag, kanker usus besar, dan pengawetan. Probiotik dapat memperbaiki keseimbangan mikroflora intestinal pada saat masuk saluran pencernaan kesehatan bagi manusia dan hewan.



tiwi dan Susanti., (2021) terdapat beberapa fungsi dari probiotik, yaitu:
1. Menjaga keseimbangan mikroorganisme normal (baik pencernaan dan kulit)
2. Memperbaiki rantai pendek-asetat, laktat, dan format yang berfungsi untuk kesehatan usus besar
3. Mengurangi kandungan nitrogen yang berpotensi berisiko dalam darah

4. Menghasilkan faktor metabolisme yang berfungsi menghambat aktivitas vital bakteri patogen yang mengurangi peradangan dan penyakit kulit.

Prinsip kerja probiotik yaitu dengan memanfaatkan kemampuan organisme tersebut dalam menguraikan rantai panjang karbohidrat, protein dan lemak. Kemampuan ini diperoleh karena adanya enzim-enzim khusus yang dimiliki oleh mikroorganisme untuk memecah ikatan. Pemecahan molekul kompleks menjadi molekul sederhana mempermudah penyerapan oleh saluran pencernaan manusia. Di sisi lain, mikroorganisme pemecah ini mendapat keuntungan berupa energi yang diperoleh dari hasil perombakan molekul kompleks (Yulia *et al.*, 2023). Mekanisme kerja probiotik antara lain yaitu melekat dan berkolonisasi dalam saluran pencernaan yang kemudian akan bekerja untuk menghambat perkembangan dari organisme patogen, berkompetisi dalam mendapatkan makanan dan memproduksi zat-zat antimikrobal, serta menstimulasi mukosa dan meningkatkan sistem kekebalan inang (Lingga *et al.*, 2023).

Kriteria probiotik harus mampu memberikan efek yang menguntungkan bagi inang yaitu dengan mengandung sejumlah sel besar hidup yang mampu bertahan dan melakukan metabolisme dalam usus halus yang memberikan efek positif bagi kehidupan mikroflora di usus halus. Selain probiotik terdapat juga prebiotik yang merupakan makanan bagi probiotik. Prebiotik sendiri merupakan karbohidrat yang tidak dicerna tubuh, namun dapat dicerna oleh mikroba yang menguntungkan dalam tubuh, sehingga meningkatkan kesehatan. Dalam kondisi normal atau seimbang bakteri ramah di usus melebihi jumlah bakteri yang tidak bersahabat. Probiotik dapat bertindak sebagai bakteri menguntungkan usus yang menciptakan penghalang fisik terhadap bakteri yang tidak bersahabat (Sari, 2021).

Menurut Dewi *et al.*, (2021) sebagian besar mikroorganisme probiotik berasal dari bakteri, terutama dari kelompok bakteri asam laktat (BAL) dan *Bifidobacterium* yang pada umumnya telah digunakan secara komersial dan telah dianggap aman untuk dikonsumsi manusia dalam jangka panjang. Bakteri probiotik dapat menghasilkan enzim yang mampu menghidrolisis berbagai nutrient, seperti memecah karbohidrat, protein, dan lemak menjadi molekul sederhana sehingga dapat memudahkan proses pencernaan dan penyerapan dalam saluran pencernaan (Oktaviani *et al.*, 2021). Keberadaan probiotik dalam saluran pencernaan dapat meningkatkan keseimbangan mikroba dalam saluran pencernaan sehingga meningkatkan penyerapan pakan serta menekan jumlah patogen dalam saluran pencernaan. Probiotik mampu meningkatkan sekresi sitokin antiinflamasi dan dapat menghalangi adesi patogen secara kompetitif pada permukaan mukosa usus sehingga dapat mencegah pertumbuhan bakteri patogen (Wiputri *et al.*, 2024).

Menurut Wiranti *et al.*, (2022) susu merupakan bahan pangan dengan nilai gizi tinggi yang mengandung asam lemak esensial dan mineral, selain itu susu mengandung protein yang dapat diserap oleh tubuh. Susu merupakan suatu bahan pangan bernilai gizi tinggi yang berasal dari pemerahan hewan seperti sapi, kerbau, kuda, kambing dan sebagainya. Menurut Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 3144/1: 2011 tentang syarat mutu susu segar, susu segar yang akan dikonsumsi harus memenuhi persyaratan dalam hal kandungan gizi dan juga terdapat syarat cemaran, kandungan mikroba maksimum, residu logam berat maksimum dan logam beracun maksimum yang telah ditetapkan. Untuk mendapatkan susu segar yang baik, maka semua usaha harus ditujukan untuk



memperkecil jumlah bakteri yang ada pada susu dengan memperhatikan beberapa faktor yang mempengaruhi kualitas susu tersebut misalnya sanitasi dan kebersihan kandang, kesehatan dan kebersihan hewan, kebersihan peralatan pemerah dan mempertahankan kemurnian susu segar. Susu memiliki nilai biologis yang tinggi karena mengandung asam amino esensial yang dibutuhkan oleh manusia dan tingkat pencernaan yang tinggi (Maharani *et al.*, 2020).

Susu memiliki komposisi yang lebih lengkap dari pada bahan pangan lain, yaitu komponen yang dibutuhkan oleh tubuh hampir seluruhnya terdapat dalam susu. Komposisi utama susu adalah protein, lemak, laktosa, mineral. Selain itu, di dalam susu juga terdapat nutrisi-nutrisi yang dibutuhkan oleh tubuh seperti vitamin, kalori, kalsium, zat besi dan phosphor. Menurunnya kualitas mutu atau kerusakan pada susu dapat disebabkan karena tercemarnya susu oleh mikroorganisme atau benda asing lain seperti penambahan komponen yang berlebihan. Air susu kaya akan protein, lemak, karbohidrat (terutama laktosa), vitamin, mineral, dan menjadi habitat yang ideal bagi pertumbuhan mikroorganisme khususnya bagi bakteri probiotik, untuk pertumbuhannya dan menghasilkan metabolit utama berupa asam laktat yang menghasilkan keadaan susu menjadi asam (Sujaya *et al.*, 2016). Jenis mikroba yang terdapat pada susu berasal dari famili *Lactobacillus* dan *Streptococcus*, mikroba-mikroba tersebut yang mengkonsumsi laktosa dalam susu dan dapat mengubahnya menjadi asam laktat (Wardhani *et al.*, 2023).

Salah satu jenis susu yang memiliki potensi besar untuk dikembangkan sebagai media probiotik adalah susu kerbau. Kerbau adalah salah satu ternak yang potensial untuk dikembangkan, karena kerbau memiliki keunggulan tersendiri dibandingkan dengan sapi, yaitu mampu hidup pada kawasan yang relatif “sulit” terutama bila pakan yang tersedia berkualitas rendah. Selain itu kerbau juga memiliki kemampuan yang cukup tinggi dalam mengatasi tekanan dan perubahan lingkungan yang ekstrem (Damayanthi *et al.*, 2014). Susu kerbau merupakan salah satu jenis susu yang kaya akan nutrisi, dengan memiliki kandungan lemak, protein, dan mineral yang bahkan lebih tinggi dibandingkan dengan susu sapi.

Menurut Alang *et al.*, (2020) kadar lemak pada susu kerbau baik tipe perah maupun tipe daging berkisar 6,6-9,0% sedangkan kadar lemak pada susu sapi berkisar antara 3,6-4,9%. Susu kerbau juga lebih kaya akan kandungan mineral penting, yaitu Ca 92%, Fe 38%, dan P 118%, memiliki kandungan kolesterol lebih rendah (0,65mg/g) dari pada sapi (3,14 mg/g) serta kandungan vitamin A yang lebih tinggi. Susu kerbau juga baik untuk kesehatan karena mengandung berbagai protein protektor yang berfungsi sebagai bioprotektif antara lain immunoglobulin, laktoferin, lisozim, laktoperoksidase, dan bifidogenic. Protein-protein tersebut berfungsi sebagai pelindung dari berbagai penyakit contohnya, laktoferin yang berfungsi sebagai antibakteri, antiinflamasi, is, dan berperan dalam sekresi pada sistem kekebalan (Matondang



laktat (BAL) merupakan bakteri anaerob fakultatif yang mampu habitat yang cukup luas di alam seperti pada tanaman, saluran an manusia, serta pada produk makanan. Dalam sejarahnya BAL tat ini pertama kali diisolasi dari susu, selanjutnya ditemukan pada nan dan produk pangan yang terfermentasi. Bakteri asam laktat

(BAL) merupakan bakteri gram positif yang sering digunakan dalam bidang industri makanan untuk fermentasi, terutama dalam memfermentasi karbohidrat dan mengubahnya asam laktat. Selain itu, bakteri asam laktat ini juga memiliki kapasitas untuk metabolisme sitrat, asam organik yang bisa ditemukan dalam suatu produk makanan (Eicher *et al.*, 2023).

Sejak sekitar tahun 1989, BAL mulai populer dipakai sebagai probiotik. Pemilihan bakteri asam laktat sebagai probiotik sangat berkaitan dengan sifatnya yang memenuhi kriteria aman untuk dikonsumsi *generally recognized assafe* (GRAS), dimana hal ini merupakan syarat utama probiotik dan kemampuannya untuk menghasilkan zat-zat yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bagi mikroorganisme lain (Wardinal *et al.*, 2019). Menurut Oktaviani *et al.*, (2021) ciri-ciri dari bakteri asam laktat secara umum adalah selnya beraksi positif terhadap pewarnaan gram, bereaksi negatif pada katalase dan tidak membentuk spora, serta fermentasi glukosa akan dihasilkan asam laktat. Bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme yang dapat hidup pada kisaran pH yang luas. Setiap strain BAL mempunyai ketahanan yang berbeda terhadap asam atau pH rendah. Toleransi terhadap pH rendah merupakan suatu syarat penting dalam isolat bakteri asam laktat untuk dapat dikembangkan menjadi sebuah kandidat probiotik. Kriteria ini dikembangkan karena isolat BAL yang akan dikembangkan menjadi probiotik harus melewati kondisi lambung yang sangat asam sebelum mencapai usus besar (Suardana *et al.*, 2017). Bakteri asam laktat (BAL) diketahui mempunyai peran penting dalam menjaga fisiologis dan kesehatan manusia dan hewan yaitu berfungsi dalam menjaga sistem kekebalan tubuh. Sepanjang hari bakteri asam laktat ini akan mengenali mikroorganisme patogen yang berbahaya dan bahan-bahan asing lainnya yang berada dalam tubuh makhluk hidup. Salah satu upaya untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh adalah dengan mengonsumsi probiotik guna menunjang metabolisme tubuh (Surbakti, 2021).

Bakteri asam laktat juga dapat bersaing untuk menghasilkan nutrisi yang baik terhadap aktivitas bakteri patogen. Penghambatan bakteri asam laktat terhadap bakteri patogen disebabkan oleh akumulasi asam organik yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat. Asam akan menyebabkan penurunan pH hingga dibawah kisaran pH pertumbuhan bakteri dimana asam-asam ini dalam bentuk tidak terdisosiasi dan dapat berdifusi secara cepat dalam sel bakteri patogen, sehingga bakteri asam laktat dapat menekan adanya pertumbuhan dari bakteri patogen (Mirdalisa *et al.*, 2016). Suhu yang optimum untuk pertumbuhan bakteri asam laktat juga berbeda-beda. Ada yang psikotropik, yaitu mampu tumbuh pada suhu 5°C atau dibawahnya, ada yang obligat tumbuh pada suhu 45°C namun tidak dapat tumbuh pada suhu 15°C (Oktaviani *et al.*, 2021).

Bakteri asam laktat yang terdapat di dalam saluran pencernaan mempunyai variasi terhadap garam empedu. Ketahanan BAL terhadap garam salah satu syarat penting untuk dapat diterima sebagai bakteri (Suardana *et al.*, 2017). Bakteri asam laktat membutuhkan karbohidrat untuk metabolismenya. Karbohidrat akan dipecah oleh enzim amilase menjadi glukosa dan galaktosa) dan diubah lagi menjadi asam piruvat. Selanjutnya akan dipecah menjadi asam organik seperti asam laktat. Energi yang dihasilkan akan dimanfaatkan oleh bakteri



dalam proses replikasi kromosom sehingga menyebabkan pembelahan sel serta dapat meningkatkan jumlah dan ukuran sel (Isrori et al., 2022).

Kemampuan bakteri asam laktat dalam mengeliminasi bakteri patogen dapat dilihat dari senyawa yang dihasilkan berupa komponen metabolit yaitu asam organik, hidrogen peroksida, bakteriosin dan komponen lainnya (Indrawati et al., 2023). Bakteriosin diketahui potensial menjadi biopreservatif pada bahan makanan. Senyawa ini berfungsi dalam memperpanjang umur simpan produk. Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dapat berupa protein yang memberikan efek bakterisidal khususnya terhadap bakteri gram positif, bakterisidal adalah senyawa yang mempunyai kemampuan untuk membunuh mikroorganisme lain. Target utama dari bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri asam laktat kemungkinan besar adalah membran sitoplasma. Bakteriosin akan mengubah permeabilitas membran sehingga akan mengganggu transpor membran atau menghilangkan tenaga gerak proton yang dapat mengakibatkan terhambatnya produksi energi dan biosintesis protein (Rahmiati dan Mumpuni, 2017).

Beberapa spesies dari BAL yang umum digunakan sebagai bakteri probiotik adalah *Lactobacillus*., *Enterococcus*, dan *Lactococcus*. *Lactobacillus* merupakan kelompok genus hampir 80 spesies berbeda. Jenis *Lactobacillus* dapat dibedakan atas dua kelompok yaitu bersifat homofermentatif dan heterofermentatif. BAL homofermentatif menghasilkan asam laktat saja sebagai produk akhir, sedangkan bakteri heterofermentatif menghasilkan asam laktat, karbondioksida, dan etanol sebagai produk akhir (Karyawatil et al., 2024). Genus *Enterococcus* termasuk ke dalam jenis bakteri penghasil asam laktat dengan ciri-ciri gram positif, berbentuk coccus (bulat), mesofilik, dan homofermentatif. Bakteri *Lactococcus* adalah bakteri gram positif yang berbentuk coccus (bulat), non motil dan tidak berspora (Lakopirnasari et al., 2022).

Sebagian besar penelitian tentang probiotik bakteri asam laktat (BAL) lebih banyak difokuskan pada susu sapi atau produk olahan susu lainnya, sementara potensi susu kerbau sebagai media pertumbuhan BAL masih sangat terbatas hal ini mengakibatkan kurangnya informasi ilmiah mengenai manfaat probiotik yang mungkin terdapat pada susu kerbau. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk dapat mengisolasi, mengkarakterisasi serta mengidentifikasi bakteri asam laktat yang ada pada susu kerbau.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan Penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. memperoleh isolat serta mengidentifikasi bakteri asam laktat yang bersifat probiotik dari susu kerbau *Bubalus bubalis*
2. menentukan karakter morfologi dan fisiologi bakteri probiotik dari susu kerbau *Bubalus bubalis*



an

elitian adalah untuk memperoleh hasil yang dapat dijadikan bahan
genai bakteri probiotik yang terdapat pada susu kerbau *Bubalus*

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari - Mei 2025. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf, enkas, inkubator, oven, penangas air, lemari pendingin, mikroskop, neraca analitik, botol steril, Erlenmeyer, gelas ukur, batang pengaduk, botol pengencer, cawan petri, tabung reaksi, spoit, *hand sprayer*, bunsen, rak tabung, ose bulat, ose lurus, pipet tetes, *objek glass*, *deck glass*, tabung durham, *cool box*, hot plate, autoklaf, vortex, DNA *thermal cycler*, seperangkat alat PCR dan elektroforesis.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu kerbau *Bubalus bubalis*, aquades steril, alkohol 70%, medium selektif MRSA (Man Rogosa Sharpe Agar), medium selektif MRSB (Man Ragosa Sharpe Broth), medium TSIA (Triple Sugar Iron Agar), reagen H₂O₂, medium SIM (Sulfid Indol Motility), medium MR-VP (Methyl Red-Voges Proskauer), medium NA (Nutrien Agar), KOH 40%, alfanaftol, metil-red, pewarnaan gram (Kristal Violet, Lugol, Alkohol-Aseton, dan Safranin), NaCl fisiologis, HCl 0,1 N, garam empedu sintetik, minyak emersi, kapas, paper disk, kertas lakmus, *cling wrap*, label, kit isolasi DNA, *loading dye*, gel agarosa, *etidium bromide* (EtBr). Presto mini gDNA Bacteria Kit (100 Preps), larutan GB Buffer proteinase K, etanol absolut, TAE Buffer, larutan wash buffer, marker 100 bp.

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Pegambilan Sampel

Sampel susu kerbau *Buballus buballis* sehat di ambil dari ternak kerbau yang berasal dari desa Barra' barra, Kelurahan Rantetayo, Kabupaten Tana Toraja. Disediakan alat-alat yang akan digunakan secara steril. Sebelum pemerahan, puting susu kambing disterilkan dengan menggunakan alkohol 70%. Setelah diperah, susu segera disepsis ke dalam botol steril, kemudian dimasukkan ke dalam *cool box* ke Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi, Universitas I tersebut selanjutnya akan di isolasi dan di karakterisasi di ologi, Universitas Hasanuddin.



2.3.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat yang digunakan disterilkan terlebih dahulu. Alat yang terbuat dari gelas disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Sedangkan alat yang terbuat dari logam dicuci dengan alkohol atau dipijarkan diatas api bunsen.

2.3.3 Pembuatan Media

a. Medium NA (Nutrien Agar)

Sebanyak 2,3 g medium NA dilarutkan ke dalam 100 mL air suling dibuat dengan pH 7,3. Kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai homogen. Selanjutnya mulut erlenmeyer ditutup dengan menggunakan aluminium foil lalu disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit

b. Medium MRSA (Mann Rogosa Sharpe Agar)

Sebanyak 6,2 g medium MRSA dan CaCO_3 1% dilarutkan ke dalam 100 L air suling dan dibuat dalam pH 6,2. Kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai homogen. Disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

c. Medium MRSB (Man Ragosa Sharpe Broth)

Sebanyak 5,2 g medium MRSB dilarutkan ke dalam 100 mL air suling dan dibuat dalam pH 6,2. Kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai homogen. Disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

d. Medium TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

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

e. Medium MR-VP (Methyl Red-Voges Proskauer)

Sebanyak 0,5 gr peptone, 0,5 gr glukosa, 0,5 mL buffer fosfat, dilarutkan ke dalam 100 ml aquades, dibuat dengan pH 8,9. Kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai homogen. Selanjutnya medium dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL, kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

f. Medium SIM (Sulfid Indol Motility)

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

2.3.4 Isolasi Bakteri Probiotik



U kerbau *Bubalus bubalis* dipipet sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan ditambahkan aquades steril sebanyak 9 mL. Kemudian diencerkan dengan pengenceran bertingkat (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Kemudian diambil 1 mL larutan dari semua tingkat pengenceran masing-masing dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi medium MRSA yang ditambahkan CaCO_3 1%, kemudian diinkubasi

selama 2-3 x 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri asam laktat ditandai dengan adanya zona bening di sekitar pertumbuhan koloni.

2.3.5 Pemurnian Bakteri Probiotik

Pemurnian dimulai dengan memilih koloni-koloni yang disekitarnya terdapat zona bening. Mensterilkan jarum ose, lalu diambil pada permukaan koloni bakteri kemudian diinokulasikan pada permukaan medium MRSA yang mengandung CaCO_3 1% dengan metode quadran streak untuk mendapatkan koloni yang terpisah. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2x24 jam. Tahap pemurnian dapat dilakukan 2-3 kali, untuk lebih menyakinkan bahwa koloni yang diperoleh benar-benar murni.

2.3.6 Pembuatan Stok Isolat Bakteri Probiotik

Setiap koloni tunggal yang berbeda dan terbentuk setelah pemurnian kemudian masing-masing diinokulasikan pada medium MRSA miring dan MRSB cair untuk persiapan pengujian selanjutnya.

2.3.7 Pengamatan Morfologi Bakteri Probiotik

Morfologi setiap koloni tunggal yang terbentuk setelah pemurnian kemudian diamati. Pengamatan yang dilakukan meliputi bentuk koloni (shape), bentuk tepi (margin), warna (colour) dan permukaan koloni (elevation). Pengamatan morfologi koloni dilakukan dengan teknik pewarnaan gram. Pertama-tama ulasan bakteri dibuat pada kaca preparat dan dilakukan fiksasi. Sebanyak 2-3 tetes gram A (kristal violet) ditetaskan pada koloni bakteri, diamkan selama 60 detik. Kemudian preparat dicuci dengan menggunakan air mengalir lalu dikering anginkan. Sebanyak 2-3 tetes gram B (larutan lugol) ditetaskan di atas preparat dan dibiarkan selama 60 detik. Preparat dicuci dengan air mengalir lalu dikering anginkan. Preparat kemudian ditetesi 2-3 tetes larutan alkohol-aseton dan dibiarkan selama 60 detik lalu dicuci kembali dan dikering anginkan. Selanjutnya preparat ditetesi dengan larutan safranin sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 60 detik, lalu dicuci dan dikering anginkan. Setelah itu diamati di bawah mikroskop.

2.3.8 Uji Potensi Isolat Sebagai Bakteri Probiotik

a. Uji Ketahanan terhadap Keasaman Lambung (pH)

Uji ketahanan terhadap keasaman lambung dilakukan dengan menggunakan medium MRSB yang ditambahkan dengan HCl 1 N untuk mendapatkan pH 3. Sebanyak 1 ose masing-masing isolat bakteri di ambil dari stok kultur kemudian diinokulasikan pada medium MRSB-HCl. Kemudian diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif apabila terjadi pertumbuhan bakteri pada medium MRSB-HCL dan hasil negatif apabila tidak terjadi pertumbuhan bakteri pada medium MRSB-HCL.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Uji Ketahanan terhadap Garam Empedu

SB sebanyak 9 mL yang ditambahkan dengan garam empedu 0.5% dan 5% sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam masing-masing tabung. Tabung tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah disterilkan diambil sebanyak 1 ose, masing-masing isolat

bakteri yang diambil dari stok kultur diinokulasikan pada medium MRSB-garam empedu, lalu inkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif apabila terjadi pertumbuhan bakteri pada medium MRSB-garam empedu dan hasil negatif apabila tidak terjadi pertumbuhan bakteri pada medium MRSB-garam empedu.

2.3.9 Uji Karakterisasi Biokimia

a. Uji Motilitas

Sebanyak 1 ose (ose lurus) isolasi bakteri diambil dari stok kultur lalu diinokulasikan dengan cara di tusuk pada medium SIM tegak, Selanjutnya diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif (motil) apabila terdapat rambatan-rambatan di sekitar bekas tusukan jarum pada medium dan hasil negatif (non motil) bila tidak terdapat rambatan-rambatan disekitar bekas tusukan jarum ose pada medium.

b. Uji MR (Methyl Red)

Sebanyak 1 ose (ose bulat) isolasi bakteri diambil dari stok kultur dan diinokulasikan pada medium MR-VP cair dalam tabung reaksi. Selanjutnya diinkubasi selama 5x24 jam pada suhu 37°C. sebanyak 0,2 mL methyi-red ditambahkan pada tabung reaksi yang berisi bakteri setelah inkubasi. Hasil positif apabila terbentuk kompleks warna merah mudah sampai merah yang menandakan bahwa mikroba tersebut menghasilkan asam.

c. Uji VP (Voges Proskauer)

Sebanyak 1 ose (ose bulat) isolasi bakteri diambil dari stok kultur dan diinokulasikan pada medium MR-VP cair dalam tabung reaksi. Selanjutnya diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 37°C. Medium kemudian ditambahkan 0.2 mL KOH dan 0,6 mL alfanafтол lalu dihomogenkan selama 30 detik. Hasil positif jika medium berubah warna lembayung.

d. Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose (ose lurus) dan masing-masing stok kultur kemudian diinokulasikan dengan cara ditusukan pada medium TSIA kemudian di ambil lagi 1 ose (ose lurus) isolat bakteri dari masing-masing stok kultur dan di gores pada permukaan medium. Selanjutnya diinkubasi selama 2-3x24 jam pada suhu 37°C. Perubahan yang diamati setelah diinkubasi adalah warna medium menjadi kuning menandakan asam, warna medium menjadi lebih merah menandakan medium menjadi lebih basa, warna menjadi hitam menandakan terbentuknya H₂S dan apabila medium terangkat menandakan bahwa mikroba tersebut mampu untuk memproduksi gas.

e. Uji Katalase

Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose (ose bulat) dan masing-masing stok kultur kemudian ditetaskan larutan reagen H₂O₂ di atas objek gelas. Hasil positif apabila terbentuk gelembung gas pada ose dan hasil negatif apabila tidak terbentuk gelembung udara.



Antibakteri

Ditujukan bahwa isolat bakteri mempunyai potensi yang bagus sebagai antibakteri. Untuk keperluan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen. yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* (bakteri gram positif) dan *Escherichia coli* (bakteri gram negatif). Langkah awal yang perlu dilakukan adalah isolat dari stok kultur pada medium MRSA miring dan diinkubasi

selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Hal yang sama dilakukan terhadap bakteri uji (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*) yang diinokulasikan pada medium NA (Nutren Agar) miring dan diinkubasikan selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, 5 ml aquades steril ditambahkan ke dalam inokulum kemudian divortex agar koloni bakteri yang menempel pada permukaan medium dapat larut. Suspensi bakteri kemudian dipindahkan ke cuvet lalu dilakukan spektrofotometri untuk mendapatkan keadaan 25% T dalam sampel dimana aquades digunakan sebagai blanko.

Sebanyak 1 ml masing-masing isolat *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diinokulasikan pada medium NA dengan metode tuang dan dibiarkan memadat. Sementara itu siapkan paper disk steril lalu direndam dalam masing-masing suspensi isolat probiotik selama 10 menit. Kemudian paper disk diletakkan di permukaan medium NA yang telah memadat, lalu diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37°C. Diameter zona bening yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong.

2.3.11 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan mengikuti protokol ekstraksi DNA yang terdapat dalam Gencaid Presto TM Mini gDNA Bacteria Kit. Pertama dilakukan preparasi sampel, untuk bakteri gram positif, jumlah bakteri sebanyak 1×10^8 sel dipindahkan ke 1,5 ml tube mikrosentrifugasi, kemudian disentrifugasi dengan waktu 1 menit dengan kecepatan 13.900 rpm lalu dibuang bagian supernatant. Dimasukkan 200ul buffer GA (buffer gram +) untuk 15 ml *centrifuge tube* dan ditambahkan 200 ul lysozyme ke dalam sampel, lalu divortex hingga lysozim benar-benar larut. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, setelah itu lakukan pembalikan setiap 10 menit. Ditambahkan 20 ul proteinase K kemudian divortex sampai proteinase K benar-benar larut. Kemudian dimasukkan 200 ul buffer GB kedalam sampel kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Diinkubasi selama 10 menit dengan suhu 70°C untuk mendapat hasil yang homogeny. Selama waktu diinkubasi dilakukan pembalikan setiap 3 menit. Lalu, ditambahkan 200 ul etanol (96%-100%) kemudian divortex lagi agar tercampur selama 15 detik.

Semua campuran dipindahkan ke dalam spin column CB3 dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. Buang semua cairan dan tempatkan spin column ke dalam tabung pengumpul. Ditambahkan dengan 500 ul buffer GD ke dalam spin column CB3 dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik, kemudian dibuang semua cairan dan tempatkan spin column CB3 ke dalam tabung pengumpul.

Kemudian, ditambahkan 600 ul buffer PW ke spin column CB3 dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik, dibuang semua cairan dan ditempatkan spin column CB3 ke dalam tabung pengumpul. Diulangi langkah ini, kemudian disentrifugasi kembali menggunakan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit hingga membrane kering



spin column CB3 ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang baru fer TE, kemudian diinkubasi pada suhu ruang (15-25°C) selama 2-ifugasi selama 2 menit pada 12.000 rpm. Supernatant yang ng Eppendorf adalah hasil dari ekstraksi DNA.

2.3.12 Amplifikasi DNA dengan Metode PCR

Metode kerja ini dilakukan pada sampel DNA yang telah diekstraksi. Dibuat campuran reaksi untuk PCR yaitu 8 ul 1x Mytaq HS Red Mix dan masing-masing 1 ul DNA gen 16S rRNA Primer Forward 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan primer reservasi 1387R (5'-GGGCGGTGTGTACAAGGC3') dan 2 ul dd H₂O. Setelah itu disiapkan tabung kemudian diisi dengan campuran reaksi PCR sebanyak 12 ul lalu ditambahkan 3 ul ekstrak DNA, dihomogenkan campuran reaksi PCR dan ekstrak DNA menggunakan vortex, kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR. Amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus terdiri dari predenaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, annealing pada suhu 55°C selama 45 detik, extending pada suhu 72°C selama 1 menit dan post extending pada suhu 72°C selama 10 menit.

2.3.13 Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis

Gel agarosa 1,5% dibuat dengan mencampurkan 1,5 gr serbuk agarosa ke dalam 100 mL TEA Buffer di Erlenmeyer kemudian dipanaskan ke dalam microwave selama 2 menit hingga mendidih, lalu ditambahkan 8 ul Ethidium Bromida. Cairan gel lalu didinginkan pada suhu kamar. Setelah agak dingin, cairan gel dituang ke cetakan gel elektroforesis dengan menggunakan sisir gel agarosa dengan jumlah sisir 17 sumur. Sebanyak 5 ul produk amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1,5% yang terendam dalam tangkai berisi TEA Buffer. Selanjutnya, elektroforesis dijalankan selama 50 menit dengan tegangan konstan 100 volt. Setelah 50 menit elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk diamati dibawah sinar UV. Hasil positif jika terdapat pita DNA yang sejajar atau memiliki ukuran yang mendekati dengan marker pada ukuran 1500 bp dan negatif jika tidak terdapat pita pada gel.

2.3.14 Sekuensing DNA

Produk PCR dari sampel yang menunjukkan hasil elektroforesis yang positif kemudian dilakukan sekuensing DNA.

2.3.15 Analisis Urutan DNA

Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan melakukan BLAST urutan nukleotida dari hasil sekuensing dengan data base yang telah tersedia pada situs www.ncbi.nlm.gov yang digunakan untuk mencari homologi sekuens nukleotida dengan sekuens data base.

2.3.16 Analisis Data

Data yang diperoleh selanjutnya diolah secara deskriptif. Hasil analisis data disajikan dalam bentuk gambar dan tabel. Setelah itu hasil identifikasi isolat bakteri dengan hasil sekuensing berbasis 16S rRNA dibuat dalam pohon filogeni untuk visualisasi kekerabatan menggunakan program MEGA 11.

