

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri Gram positif yang memiliki peran penting dalam berbagai bidang, utamanya bidang pangan fungsional karena kemampuannya menghasilkan metabolit bioaktif seperti asam organik, bakteriosin, vitamin, dan eksopolisakarida (Loo et al., 2025). Asam laktat yang dihasilkan dari proses fermentasi BAL diketahui dapat menghambat pertumbuhan mikroba patogen, dan gabungan dengan asam organik lainnya dapat mempertahankan aktivitas antimikroba BAL dalam makanan (Icer et al., 2023). BAL berkontribusi nyata terhadap tekstur, rasa, dan aroma yang diinginkan dari makanan fermentasi, dan secara signifikan mempertahankan nilai gizi produk makanan. Penelitian oleh Ayed et al. (2024) menjelaskan bahwa produksi senyawa antimikroba dan sintesis eksopolisakarida mampu memperpanjang umur simpan produk pada makanan fermentasi.

Selain sebagai agen aktif penting dalam produksi makanan, BAL juga dikenal dengan sifat probiotiknya yang memainkan peranan penting dalam meningkatkan kesehatan, dan mendukung pencernaan dengan menjaga keseimbangan mikrobiota usus (Ayed et al., 2024). Probiotik BAL dapat mencegah penyakit seperti alergi makanan, rinitis alergi, dan gangguan gastrointestinal. Probiotik BAL memiliki efek penyembuhan luka pada sel usus, berpotensi meningkatkan imunitas tubuh, mencegah penyebaran penyakit tertentu seperti diabetes, dan memiliki aktivitas antikanker (Ilikkan, 2025; El Ghany et al., 2015).

Mengacu pada manfaat dan peran penting BAL, diperlukan ketersediaan stok dalam jumlah memadai untuk mendukung proses produksi dan penelitian. Untuk itu, diperlukan metode penyimpanan yang tepat agar BAL tetap viabel dan dapat digunakan kapan saja. Penyimpanan bakteri dalam jumlah tertentu untuk keperluan penggunaan kembali di masa mendatang dapat dilakukan melalui proses konservasi. Konservasi adalah suatu upaya sistematis untuk menjaga kelangsungan hidup dan aktivitas biologis mikroorganisme terutama untuk penyimpanan jangka panjang (Ong et al., 2022). Konservasi bakteri sangat penting untuk menjaga kultur tetap viabel, murni, dan stabil serta mempertahankan sifat-sifat biokimia, genetik, fisiologis, dan morfologis tetap konstan (Loo et al., 2025).

Berbagai metode konservasi telah dikembangkan untuk menjaga viabilitas BAL. Metode yang paling umum digunakan adalah pengeringan beku (*freeze drying*) (Vivek et al., 2023). Pengeringan beku banyak dipilih karena mampu menjaga struktur dan viabilitas sel lebih baik terutama pada penyimpanan jangka panjang (Rachmat dan Shovitri, 2021). Pengeringan beku juga dikenal sebagai liofilisasi (*Liophilization*) yang melibatkan pembekuan cepat sel mikroba, kemudian penghilangan air secara sublimasi di bawah tekanan rendah, sehingga stres termal dapat dihindari. Namun pada proses pembekuan, pembentukan kristal es dapat merusak membran sel dan menyebabkan inaktivasi mikroba (Yang et al., 2023). Oleh

karena itu, proses liofilisasi sering kali dilengkapi dengan penggunaan bahan penyalut atau krioprotektan yang berfungsi melindungi sel dari kerusakan.

Bahan penyalut yang umum digunakan dalam konservasi BAL salah satunya yaitu *skim milk* (Yang et al., 2023). *Skim milk* mengandung protein dan laktosa yang dapat membentuk lapisan pelindung di sekitar sel, sehingga mengurangi stres akibat pembekuan dan dehidrasi. Protein susu mampu menjaga integritas membran sel dan mencegah kerusakan struktur akibat tekanan osmotik. Selain itu, laktosa dalam *skim milk* membantu menstabilkan lingkungan mikro selama proses pengeringan dengan berperan sebagai matriks penyangga (Suo et al., 2021). Penelitian oleh Ibrahim et al., (2023) menunjukkan bahwa penambahan *skim milk* mampu meningkatkan viabilitas sel probiotik secara signifikan setelah pengeringan beku. Pemilihan metode konservasi dan bahan penyalut yang tepat sangat menentukan keberhasilan konservasi itu sendiri serta kualitas dan viabilitas mikroba setelah rehidrasi atau aplikasi ulang (Raddats et al., 2019).

Berdasarkan uraian di atas, dilakukan penelitian untuk menganalisis kemampuan tumbuh bakteri asam laktat dari ayam kampung *Gallus domesticus* dan itik betina *Anans domesticus* setelah dilakukan penyimpanan atau konservasi dengan menggunakan *skim milk* sebagai media pelindung.

1.2 Dasar Teori

1.2.1 Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat (BAL) secara harafiah diartikan sebagai sekelompok bakteri yang menghasilkan asam laktat sebagai produk sampingan utama dari metabolisme karbohidrat (George et al., 2018). Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri Gram positif, katalase-negatif, tidak membentuk spora, dan dapat memfermentasi berbagai macam sakarida untuk menghasilkan asam laktat (Ayivi & Ibrahim, 2022; He et.al., 2024). Berdasarkan produksi asam laktatnya, bakteri asam laktat diklasifikasikan menjadi strain homofermentatif yang mengubah gula menjadi hampir seluruhnya asam laktat (Ashaolu & Reale, 2020), dan strain heterofermentatif yang menghasilkan campuran asam laktat, etanol atau asam asetat, dan karbon dioksida (Zeise et al. 2021).

Senyawa asam yang dihasilkan bakteri asam laktat bermanfaat baik itu pada rasa dan tekstur makanan fermentasi, juga sebagai penghambat mikroba yang tidak diinginkan. Selain itu, bakteri asam laktat juga mensintesis berbagai metabolit yang bermanfaat sebagai agen antijamur, anti-mikotoksigen, dan bakteriosin (Ashaolu & Reale, 2020). Bakteri asam laktat mensintesis beberapa zat bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan manusia, termasuk asam organik, asam gamma aminobutirat (GABA), eksopolisakarida (EPS), vitamin, bakteriosin, dan enzim, yang semuanya dapat meningkatkan nilai kesehatan dan kualitas produk makanan (He et al., 2024).

Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri yang mencakup banyak genera terkenal termasuk *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella*, dan *Bifidobacterium* (Jaffar et al., 2023). Spesies dari genus *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* sebagian besar berasal dari

saluran pencernaan manusia dan hewan, dan beberapa produk fermentasi. Spesies genus *Leuconostoc* umumnya diisolasi dari daging dingin atau sumber klinis. Spesies genus *Pediococcus* dikaitkan dengan pembusukan minuman fermentasi terutama bir. Spesies genus *Lactococcus* dan *Streptococcus* paling melimpah dalam produk susu seperti susu asam. Spesies genus *Enterococcus* dapat ditemukan pada bahan makanan, sedangkan spesies genus *Weisella* dapat ditemukan pada kulit (Mokoena, 2017; Ayivi & Ibrahim, 2022).

Bakteri asam laktat banyak digunakan sebagai *culture starter* untuk berbagai fermentasi produk makanan seperti fermentasi susu, daging dan tepung. Seleksi galur bakteri asam laktat sebagai starter sangat penting untuk meningkatkan kualitas produk akhir, serta aman bagi mikroorganisme lain di dalam tubuh. Kriteria yang dapat digunakan untuk seleksi tersebut adalah kemampuan produksi asam laktat, sensitivitas antibiotik, dan viabilitas yang tinggi (Pratama et al., 2019). Selain itu, bakteri asam laktat juga dapat digunakan sebagai probiotik yang bermanfaat bagi kesehatan manusia dan hewan (Sanz et al., 2021). Bakteri asam laktat yang digunakan sebagai bakteri probiotik memerlukan penilaian keamanan yang cermat, dengan mematuhi pedoman seleksi yang ditetapkan. Bakteri asam laktat dikatakan probiotik apabila bersifat non-patogen, umumnya memenuhi status GRAS (*Generally Recognized as Safe*), mentolerir pH rendah dan konsentrasi tinggi garam empedu, dan tidak menghasilkan pembentukan antibodi (Mokoena, 2017).

1.2.2 Bakteri Probiotik

Probiotik berasal dari bahasa Yunani yang berarti “untuk kehidupan”. Kelompok kerja gabungan Organisasi Pangan dan Pertanian (FAO) yang didukung oleh Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) pada tahun 2001 dan Asosiasi Ilmiah Internasional untuk Probiotik dan Prebiotik (ISAPP) mendefinisikan probiotik sebagai mikroorganisme hidup yang ketika diberikan dalam jumlah yang cukup, memberikan manfaat kesehatan bagi inangnya (Koh et al., 2022). Definisi lain dari probiotik oleh *World Gastroenterology Organisation* (WGO) yaitu mikroorganisme hidup yang memberikan manfaat bagi kesehatan konsumen apabila dikonsumsi dalam jumlah yang cukup (WGO, 2009). Probiotik dapat berinteraksi dengan bakteri gastrointestinal lain dalam usus dan memberikan manfaat besar bagi organisme inangnya (Ayivi & Ibrahim, 2022).

Probiotik umumnya banyak terdapat di dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. Kehadirannya dapat mempengaruhi mikroflora usus dan meningkatkan daya kerja saluran pencernaan (Zeashan et al., 2020). Selain itu, probiotik dapat ditemukan pada produk susu seperti keju, yogurt, dan es krim, dan produk non-susu seperti daging, buah-buahan, sereal, coklat, dan lainnya. Hal ini memungkinkan probiotik dijadikan sebagai suplemen makanan, sehingga dibutuhkan penanganan yang baik untuk mengurangi potensi kehilangan viabilitas selama penyimpanan. Probiotik adalah sekelompok bakteri yang banyak diaplikasikan dalam industri makanan, maupun untuk pengembangan kesehatan (Ayivi & Ibrahim, 2022).

Sifat umum bakteri probiotik adalah merupakan bagian alami dari sistem pencernaan baik pada manusia maupun hewan, tidak patogen, resistensi terhadap

antibiotik, stabil terhadap oksigen, garam empedu, asam lambung, dan enzim, aman dikonsumsi, melekat pada dinding usus, dan menghasilkan agen antimikroba untuk melindungi dinding usus (Vivek et al., 2023). Bakteri dapat dikatakan probiotik apabila memenuhi beberapa kriteria penting yaitu manfaat kesehatan yang spesifik dan terukur; pertimbangan keamanan; karakteristik isolasi strain; mampu berkolonisasi; mampu bertahan dalam bahan makanan; dapat mentolerir kondisi gastrointestinal; kemampuan adhesi yang tinggi pada epitel usus; menstabilkan mikroflora usus; menghambat pertumbuhan patogen; memiliki sifat antimutagenik dan antikarsinogenik; muda diproduksi dalam skala besar (Melo et al., 2018).

1.2.3 Jenis-jenis Bakteri Probiotik

Jenis bakteri probiotik yang paling banyak dipelajari adalah bakteri penghasil asam laktat atau yang dikenal dengan sebutan bakteri asam laktat (Bianchi et al., 2001). Genus bakteri yang paling umum digunakan sebagai probiotik saat ini adalah genus *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria* (Sniffen et al., 2018). *Lactobacilli* adalah genus bakteri mikroaerofilik gram positif, dan tidak membentuk spora. *Lactobacilli* memproses laktosa dengan pelepasan asam laktat. Selain itu, juga dapat mengubah glukosa dengan bertindak sebagai homofermentatif maupun heterofermentatif (Tyutkov et al., 2022). Spesies dari genus *Lactobacilli* antara lain *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, subsp. *bulgaricus*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*. *Lactobacilli* dapat menghasilkan asam organik, asam lemak, hidrogen peroksida, diasetil, reuterin, dan reutericyclin serta produk lainnya yang mengendalikan pertumbuhan mikroflora patogen (Tyutkov et al., 2022).

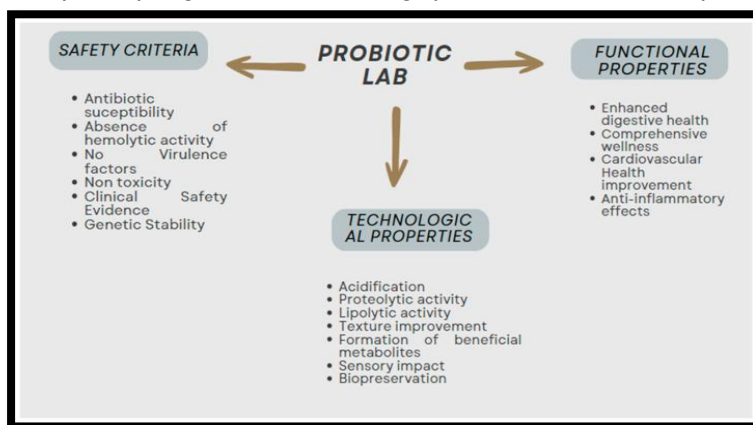
Bifidobacteria adalah bakteri gram positif, tidak membentuk spora, anaerob non-motil. Bakteri ini memproses gula dengan pembentukan asam laktat dan asam asetat (Sgorbati et al., 1995). *Bifidobacteria* menghasilkan beberapa vitamin (B1, B6, B9, B12, dan PP), asam amino (alanin, valin, asam aspartat, dan treonin), asam laktat, dan juga dapat menekan intoleransi laktosa (Tyutkov et al., 2022). Spesies dari genus *Bifidobacteria* antara lain *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. animalis*, subsp. *lactis*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. thermophilum* (Tripathi & Giri, 2014).

Genus *Bacillus*, beberapa khamir, dan mikroorganisme lain juga digunakan sebagai probiotik. Spesies dari genus *Bacillus* antara lain *B. cereus*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. polyfermenticus*, *B. subtilis*. Adapun spesies lainnya yaitu *Streptococcus thermophilus*, *Saccharomyces boulardii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (Tyutkov et al., 2022), *Weissella cibaria* (Mahmoodian et al., 2024), *Leuconostoc mesenteroids*, *Pediococcus acidilactici*, dan *Lactococcus lactis* (Vivek et al., 2023). Meskipun sebagian besar probiotik berstatus GRAS (*generally considered as safe*), namun harus digunakan dengan hati-hati dan status GRAS harus diperoleh untuk setiap penggunaan spesifik (Tyutkov et al., 2022).

1.2.4 Manfaat Kesehatan Bakteri Probiotik

Probiotik dalam manfaatnya bagi kesehatan dapat digunakan untuk mencegah dan mengobati berbagai gejala klinis antara lain penyakit metabolik

seperti kolesterol (Rondanelli et al., 2017), gangguan gastrointestinal seperti infeksi *Helicobacter pylori*, diare, sindrom iritasi usus, dan penyakit radang usus (Kucukgoz dan Trzaskowska, 2022), dan penyakit alergi seperti rinitis alergi (Rondanelli et al., 2017). Probiotik yang berperan dalam penurunan penyakit metabolik kolesterol yaitu *Lactobacillus acidophilus*. Probiotik yang efektif mengobati infeksi *Helicobacter pylori* yaitu kombinasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium animalis* (Rondanelli et al., 2017). Probiotik *Saccharomyces boulardii* dan *Lactobacillus rhamnosus* GG secara signifikan mengurangi perkembangan diare (Markowiak dan Slizewska, 2017). Probiotik *Bifidobacterium infantis* dapat mengurangi nyeri dan perut kembung pada pasien dengan sindrom iritasi usus (Liu et al., 2018). Pencegahan dan pengobatan radang usus dapat menggunakan probiotik spesies *Lactobacillus rhamnosus* GG. Kemampuan *Lactobacillus rhamnosus* GG melekat pada sel-sel usus dan pada lendir, dapat memperkuat barier mukosa usus sehingga meringankan peradangan usus (Ryma et al., 2021). Adapun probiotik *Lactobacillus paracasei* berperan pengobatan rinitis alergi (Rondanelli et al., 2017).



Gambar 1. Manfaat Kesehatan Bakteri Probiotik
Sumber: Ayed et al., 2024

Efek kesehatan dari bakteri probiotik dapat diperoleh hanya dengan ketentuan bakteri tersebut harus dalam keadaan masih hidup ketika dimasukkan ke dalam usus sebagai lokasi targetnya (Islam et al., 2010). Adapun konsentrasi probiotik yang dibutuhkan kurang lebih 10^6 CFU/mL di usus halus dan 10^8 CFU/mL di usus besar (Minelli & Benini, 2008). Penggunaan dosis yang sesuai dapat memaksimalkan efek kesehatan dari bakteri probiotik. Dosis efektif yang umum pada manusia adalah $10^7 - 10^9$ CFU/mg per hari (Minelli & Benini, 2008).

Selain manfaat yang terbukti secara klinis, penggunaan probiotik untuk pengelolaan fungsi imun juga sangat menjanjikan (Gill & Guarner 2004). Bakteri probiotik dapat menstimulasi jalur pro-inflamasi, meningkatkan jalur sitokin, dan menyebabkan respon imun termediasi sel tanpa menargetkan sistem imun inang. Semua probiotik merangsang respon imun dengan pertumbuhan bakteri menguntungkan, dan memperkuat mekanisme pertahanan alami tubuh, selain membatasi mikroorganisme berbahaya yang menyerang usus (Vivek et al., 2023).

1.2.5 Probiotik dan Produk Makanan



Gambar 2. Manfaat Bakteri Probiotik dalam Produk Pangan
Sumber: Icer et al., 2023

Produksi makanan fungsional yang mengandung bakteri probiotik terenkapsulasi mengalami peningkatan dalam beberapa waktu terakhir (Burgain et al., 2011). Berdasarkan manfaat kesehatan yang telah dirasakan, probiotik telah dimasukkan ke dalam berbagai produk susu seperti yougurt, keju, es krim, dan makanan penutup olahan susu lainnya. Perkembangan pasar produk probiotik berdampak pada probiotik yang juga dimasukkan ke dalam produk non-susu seperti coklat, sereal, jus buah dan produk serupa lainnya (Vivek et al., 2023). Strain probiotik yang digunakan dalam pembuatan makanan probiotik adalah *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Bacillus*, dan *Saccharomyces* (Wang et al., 2024).

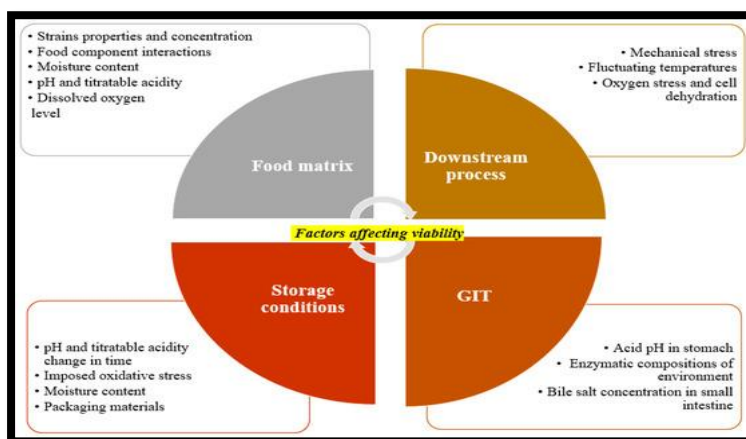
Probiotik yang digunakan dalam produk susu adalah bakteri asam laktat strain *Lactobacillus* yang bersumber dari susu tradisional seperti susu unta, yougurt, dan keju buatan sendiri (Kim et al., 2022), strain *Bifidobacterium* yang utamanya ditemukan dalam ASI (Wang et al., 2024), dan strain *Streptococcus* yang bersumber dari yougurt tradisional Tiongkok, ASI, susu sapi (Liu et al., 2022). Probiotik ini dapat menghasilkan lebih banyak senyawa terkait kesehatan dalam produk susu, mengatur keseimbangan mikrobiota usus, dan menghambat mikroorganisme berbahaya dalam tubuh (Wang et al., 2024).

Probiotik yang digunakan dalam produk non-susu juga semakin banyak mendapat perhatian, dengan strain *Bacillus* sebagai yang paling banyak dilaporkan. Strain *Bacillus* ini bersumber dari berbagai lingkungan termasuk usus ikan flounder zaitun dan kotoran ayam (Deng et al., 2021). Jenis probiotik lainnya mencakup *Leuconostoc mesenteroides*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Pediococcus acidilactic*, *Saccharomyces boulardii*, *Faecalibacterium prausnitzii*. Probiotik ini dapat diperoleh dari berbagai sumber termasuk diantaranya usus unggas, susu mentah, dan makanan yang berasal dari singkong (Wang et al., 2024). Probiotik ini mengoptimalkan struktur dan habitat bakteri dalam saluran pencernaan, mendorong pertumbuhan dan stabilitas bakteri menguntungkan, dan meningkatkan pemanfaatan nutrisi di lingkungan usus (Pimentel et al., 2021).

Penambahan probiotik pada makanan bergantung pada spesies, strain, jenis makanan, pH matrix makanan, dan kemungkinan interaksi dengan bakteri lain. Setiap spesies bakteri memiliki karakteristik metabolisme, laju pertumbuhan, aktivitas proteolitik, dan jenis substrat yang diperlukan untuk kelangsungan hidup dan ketahanan terhadap kondisi stres selama pemrosesan (Vivek et al., 2023). Kinerja strain probiotik sangat bergantung pada dosis konsumsi yang memadai pada produk makanan tersebut. Dosis yang dikonsumsi, kelangsungan hidup selama produksi, penyimpanan dan pencernaan merupakan hal penting yang perlu diperhatikan untuk mendapatkan manfaat efektif dari strain probiotik (Wang et al., 2024). Produk probiotik yang tersedia dalam bentuk bubuk kering memiliki permintaan pasar yang lebih meningkat karena kenyamanan, biaya rendah, stabilitas tinggi, serta mudah dimasukkan ke dalam berbagai makanan (Vivek et al., 2023).

1.2.6 Stabilitas dan Viabilitas Bakteri Asam Laktat

BAL memiliki peranan yang sangat penting baik itu dalam bidang kesehatan maupun produksi makanan tertentu yang dijadikan sebagai makanan probiotik (Mokoena, 2017). BAL harus stabil secara metabolik dan aktif dalam produk makanan, dan bertahan dalam jumlah besar di saluran pencernaan, untuk dapat merasakan efek menguntungkan yang diberikan (Vivek et al., 2023). Berdasarkan peranannya tersebut, menjaga stabilitas dan viabilitas BAL sangat penting untuk mendapatkan fungsionalitas yang optimal.



Gambar 3. Faktor-faktor yang mempengaruhi Viabilitas BAL

Sumber: Palanivelu et al., 2022

Stabilitas BAL dapat dipengaruhi berbagai faktor termasuk genus, spesies, biotipe galur, terutama kondisi penyimpanan (Minelli dan Benini, 2009). Kemampuan bertahan hidup berbagai spesies seperti *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. casei*, dan *L. johnsonii* dalam kondisi asam lebih tinggi dari *L. bulgaricus*. Sekitar 1-10% *L. acidophilus* yang tertelan dalam produk fermentasi ditemukan mampu bertahan hidup dari kondisi asam dalam ileum (Minelli dan Benini, 2009). Kemampuan bertahan hidup yang tinggi juga ditemukan pada *Bifidobacterium* spp.

dengan konsentrasi di ileum mencapai 10^8 dan 10^7 CFU/mL. *Bacillus subtilis* menunjukkan stabilitas dan viabilitas tinggi terhadap faktor uji (waktu dan suhu pemanggangan, aktivitas air, kadar lemak, dan kadar garam) dalam pemrosesan makanan (Payne et al., 2024).

Viabilitas sel merupakan parameter penting bagi BAL untuk mengetahui jumlah sel, terlepas dari komponen sel apa yang mungkin aktif (Espina et al., 2024). Pada enkapsulasi *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG menunjukkan viabilitas tertinggi 65,95% dalam uji ketahanan termal yaitu suhu 80°C selama 5 menit, dan setelah penyimpanan selama 7 minggu pada suhu 8°C mampu mempertahankan kelangsungan hidup sel pada akhir periode dengan jumlah 8,02 log CFU/g (Santos et al., 2025). Spesies *Lactobacillus casei* mampu mempertahankan viabilitasnya hingga $7,42 \pm 0,08$ log CFU/g⁻¹ setelah penyimpanan 20 hari (Li et al., 2023). Spesies *Lactobacillus rhamnosus* GG mampu mempertahankan viabilitasnya dari 24,59% ke 54,96% setelah proses enkapsulasi dengan metode pengeringan semprot (Yin et al., 2024). Spesies *Bifidobacteria* mampu mempertahankan viabilitasnya 73,3% - 96,9% setelah pengeringan beku (Huang et al., 2024). Spesies *Lactiplantibacillus plantarum* mampu mempertahankan viabilitasnya sampai 68, 33% atau sekitar 10^8 CFU/mL pada enkapsulasi dengan metode pengeringan beku (Espina et al., 2024).

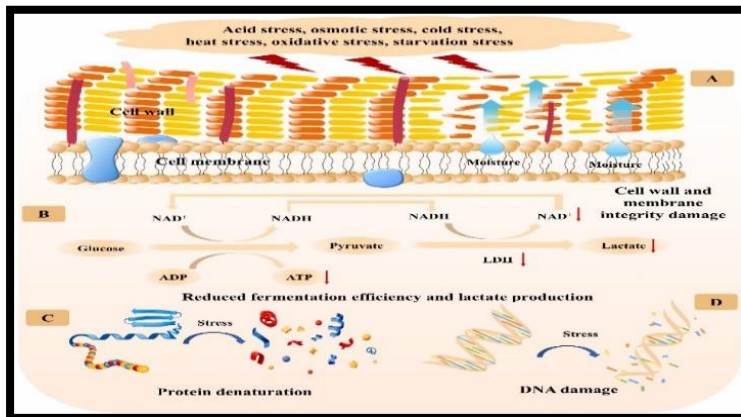
Kelangsungan hidup BAL adalah interaksi kompleks antara strain mikroba, matriks pelindung, dan kondisi proses (Payne et al., 2024). Hilangnya viabilitas strain dapat dikaitkan dengan BAL yang mengalami stres selama pemrosesan, dan jenis matriks pelindung yang digunakan dapat menjaga viabilitas strain baik itu selama tahap pemrosesan sampai penyimpanan (Huang et al., 2024). BAL harus mampu bertahan dalam kondisi pemrosesan, dan bertahan dalam jumlah yang cukup selama penyimpanan (Vivek et al., 2023).

1.2.7 Konservasi Bakteri Asam Laktat

Konservasi bakteri asam laktat (BAL) merujuk pada upaya pelestarian dan pemeliharaan viabilitas BAL dalam jangka waktu tertentu agar tetap aktif secara biologis dan fungsional saat digunakan. Metode pelestarian yang tepat berkontribusi untuk menjaga stabilitas genetik dan viabilitas mikroorganisme dalam jangka waktu yang lama (Ong et al., 2022). Prinsip dasar konservasi yaitu mempertahankan karakteristik organisme dengan tetap memperhatikan kebutuhan hidup organisme tersebut agar tetap terpenuhi, guna menjaga sifat-sifat organisme yang telah diseleksi. Mengingat peran penting BAL terutama pengaplikasiannya dalam masyarakat, upaya pelestarian dengan tetap mempertahankan stabilitas dan viabilitas menjadi penting untuk menjaga bakteri tetap hidup dan aktif secara fungsional (Mahmoodian et al., 2024).

Konservasi bakteri asam laktat sangat penting untuk menjaga kultur tetap viabel, murni, dan stabil serta mempertahankan sifat-sifat biokimia, genetik, fisiologis, dan morfologis tetap konstan. Konservasi yang tidak optimal dapat menurunkan viabilitas mikroorganisme yang pada akhirnya dapat menyebabkan kematian kultur.

Hal ini juga dapat memodifikasi kemampuan mikroorganisme dalam memproduksi senyawa tertentu sehingga diperoleh produk yang heterogen.



Gambar 4. Jenis Kerusakan pada Sel Bakteri Asam Laktat
Sumber: He et al., 2024

Gambar 1. menunjukkan kondisi stres yang menyebabkan berbagai jenis kerusakan pada sel bakteri asam laktat. Gambar bagian (A) kerusakan integritas dinding sel dan membran. Dinding sel dan membran menyusut atau pecah, mengakibatkan perubahan selektivitas dan permeabilitas. Gambar bagian (B) pengurangan efisiensi fermentasi dan produksi laktat. Stres mengurangi aktivitas enzim glikolisis, menurunkan pembentukan ATP, mengganggu aktivitas LDH, menurunkan produksi laktat, dan mengganggu efisiensi regenerasi NAD^+ . Gambar bagian (C) denaturasi protein. Stres mengganggu struktur protein, yang menyebabkan kelainan struktural dan fungsional. Gambar bagian (D) kerusakan DNA. Stres menyebabkan kerusakan DNA, serta mengganggu proses replikasi dan transkripsi. NAD^+ : Nicotinamide adenine dinucleotide; NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide, bentuk tereduksi; LDH: Lactate dehydrogenase (He et al., 2024).

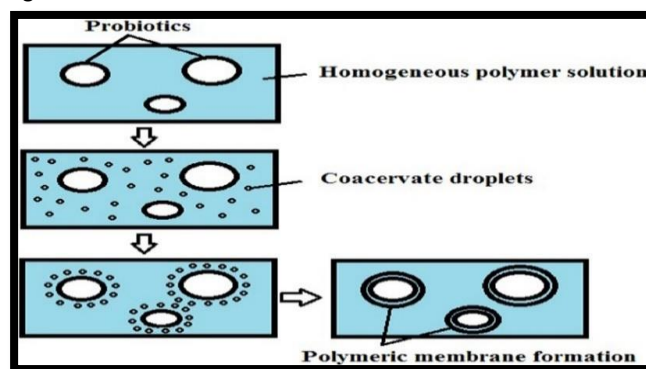
Terdapat beberapa metode yang digunakan untuk konservasi bakteri probiotik, beberapa diantaranya yaitu koaservasi (*coaservation*), emulsifikasi (*emulsification*), pengeringan semprot (*spray drying*), dan pengeringan beku (*freeze drying*) atau liofilisasi. Penelitian oleh Rodrigues et al. (2020) menjelaskan bahwa metode *freeze drying* merupakan salah satu metode terbaik untuk pengawetan kultur jangka panjang dari berbagai jenis mikroorganisme. Konservasi akan sangat bervariasi dari satu spesies ke spesies lain, atau bahkan dari satu strain ke strain yang lainnya. Kondisi ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti stadium pertumbuhan kultur, dan agen protektan yang digunakan.

a. Metode Koaservasi (*Coaservation*)

Koaservasi adalah metode enkapsulasi yang banyak digunakan untuk probiotik. Metode koaservasi bekerja berdasarkan pemisahan fase dari larutan polimer menjadi dua fase yaitu fase kaya polimer (koaservat) dan fase encer

(supernatan). Proses ini terjadi karena adanya perubahan pH, suhu, atau penambahan zat lain seperti garam atau polimer bermuatan berlawanan yang menyebabkan polimer terpisah dari larutannya (Vivek et al., 2023). Koaservasi dibedakan menjadi dua jenis yaitu koaservasi sederhana, dan koaservasi kompleks. Koaservasi sederhana menggunakan satu jenis polimer misalnya gelatin, dan pemisahan fase dipicu dengan penambahan garam, alkohol, atau perubahan pH. Koaservasi kompleks menggunakan dua polimer bermuatan berlawanan seperti gelatin dan gum arab, dan koaservat terbentuk karena adanya interaksi elektrostatik antar polimer (Moulik et al., 2022). Tahapan umum metode koaservasi terdiri dari:

- *Dispersi inti*: Bahan aktif (inti) dilarutkan atau didispersikan dalam medium.
- *Penambahan polimer*: Polimer dilarutkan, lalu dicampurkan kedalam larutan yang berisi bahan aktif untuk membentuk sistem emulsi.
- *Induksi koaservasi*: Mengubah kondisi lingkungan seperti suhu, pH, atau penambahan bahan lain agar polimer memisah dan membentuk lapisan di sekitaran inti.
- *Stabilisasi dinding kapsul*: Dilakukan dengan pendinginan, pengeringan, atau penambahan bahan pengikat (*cross-linking agent*) untuk memperkuat lapisan atau dinding kapsul.
- *Pemumian dan pengeringan*: Mikro kapsul dipisahkan dari larutan, lalu dikeringkan. Hasil akhirnya adalah partikel kecil yang terlindungi oleh lapisan pelindung.



Gambar 5. Tahapan Pencampuran Polimer dengan Bahan Aktif

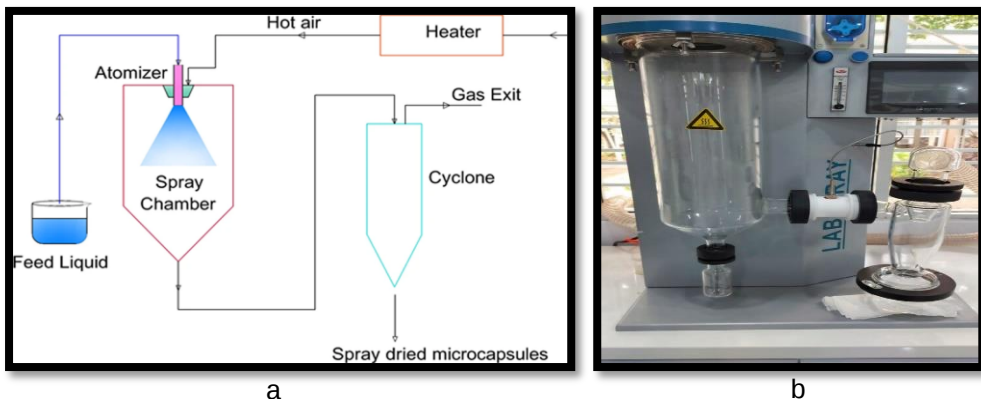
Sumber: Vivek et al., 2023

Koaservasi merupakan metode dengan biaya yang relatif murah dan mampu menghasilkan kapsul dengan kapasitas muatan tinggi, pelepasan bahan aktifnya dapat terkontrol, dan tidak memerlukan kondisi reaksi ekstrem seperti suhu tinggi untuk mengeringkan lapisan pelindungnya (Agriopoulou et al., 2023). Berbagai probiotik telah dienkapsulasi melalui proses koaservasi kompleks seperti *L. plantarum*, *casei*, *paracasei*, *B. lactis*, *L. acidophilus* dan *L. reuteri*. Yin et al. (2023) telah mengenkapsulasi probiotik *Lactobacillus rhamnosus* GG menggunakan protein whey-minyak lemak titik leleh tinggi dan gum Arab melalui koaservasi kompleks dan melaporkan tingkat kelangsungan hidup yang lebih tinggi sebesar 54,96%. Namun,

metode koaservasi utamanya koaservasi kompleks sulit untuk ditingkatkan karena lapisan pelindung yang digunakan untuk membentuk koaservasi harus dalam bentuk cair. Jenis polimer yang digunakan juga terbatas karena koaservasi hanya stabil dalam rentang pH, kekuatan ionik, dan suhu tertentu. Gelatin adalah polimer yang paling umum digunakan dalam metode ini. Meskipun demikian, penggunaan protein dari hewan seperti gelatin terbatas dalam situasi tertentu (Koh et al., 2022).

b. Metode Pengeringan Semprot (*Spry Drying*)

Pengeringan semprot (*spry drying*) adalah salah satu metode lain untuk membungkus bahan aktif menggunakan sistem dua fase cairan dan udara (Singh et al., 2022). Dalam industri pangan, metode ini paling sering digunakan untuk mengeringkan campuran yang mengandung bahan aktif menjadi bubuk probiotik. Prinsip dalam pengeringan semprot adalah proses perpindahan massa dan panas secara bersamaan antara udara panas dan tetesan (Koh et al., 2022). Pengeringan semprot merupakan proses pengeringan yang memungkinkan produksi partikel bubuk probiotik secara terus menerus diikuti dengan penyemprotan kultur stok cair di dalam ruang pengering (Rajam & Subramanian, 2022).



Gambar 6. (a) Tahapan Pengeringan Semprot, (b) Alat Pengeringan Semprot

Sumber: https://labftp.ub.ac.id/wp-content/uploads/2023/02/spray-dryer_compresss-768x1364.jpg

Pengeringan semprot terdiri dari empat tahap proses yaitu:

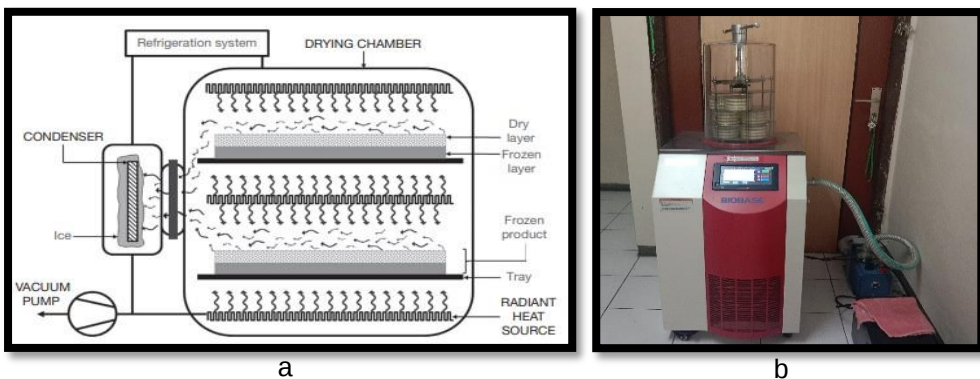
- *Atomisasi:* Kultur cair dipecah menjadi jutaan tetesan berukuran mikron (10 – 200 μm).
- *Pencampuran:* Tetesan yang terbentuk bercampur dengan udara panas yang bergerak dengan kecepatan tinggi dalam ruang pengering.
- *Penguapan:* Kontak tetesan dengan udara panas menyebabkan terjadinya perpindahan panas dari udara panas ke tetesan yang disertai dengan terjadinya penguapan sehingga tetesan tersisa dalam bentuk bubuk kering.

- *Pemisahan*: Bubuk kering dikeluarkan dari ruang pengering ke pemisah serbuk dengan aliran udara pengering. Ruang pengering semprot dilengkapi dengan pemisah siklon untuk memudahkan pengumpulan serbuk kering.

Metode pengeringan semprot adalah metode ekonomis dengan proses cepat dan berkesinambungan. Metode ini sangat mudah untuk ditingkatkan. Produk yang dihasilkan berupa bubuk kering yang sangat stabil dengan kadar air yang rendah (Koh et al., 2022). Penelitian oleh Jantzen et al. (2013) menunjukkan bahwa probiotik *L. reutri* yang dikultur dalam bubur whey dan melalui metode pengeringan semprot, menunjukkan tingkat kelangsungan hidup 32% lebih besar setelah terpapar cairan pencernaan. Kadar air produk yang dikeringkan dengan semprot juga lebih rendah, berkisar antara 5,52% hingga 9,47% (Rajam & Anandharamakrishnan, 2015). Namun, terdapat kelemahan dari metode ini dimana strain probiotik yang digunakan terbatas hanya pada probiotik yang toleran terhadap kisaran suhu tinggi selama pengeringan (Singh et al., 2022). Suhu tinggi dan tekanan osmotik selama pengeringan semprot dapat menyebabkan hilangnya sel bakteri. Kerusakan pada membran sel bakteri sangat rentan karena dehidrasi dan stres termal yang terjadi secara bersamaan (Koh et al., 2022).

c. Metode Pengeringan Beku (*Freeze Drying*)

Pengeringan beku (*freeze drying*) adalah teknik pengeringan yang lebih nyaman dan umum digunakan untuk mengawetkan bakteri probiotik. Pengeringan beku juga dikenal sebagai liofilisasi (*liophilization*) yang menggabungkan tahapan pembekuan dengan tahapan sublimasi (Koh et al., 2022).



Gambar 7. (a) Tahapan Pengeringan Beku, (b) Alat Pengeringan Beku
Sumber: Dokumentasi Pribadi

Tiga tahapan utama proses pengeringan beku yaitu:

- *Pembekuan*: Tahapan pembekuan dimulai dengan pembentukan kristal es dalam larutan cair dan mengakibatkan pemisahan molekul air dari larutan oleh kristal es.
- *Pengeringan primer (sublimasi)*: Selanjutnya pada tahapan pengeringan primer, kristal es dikeluarkan dari produk beku dengan cara sublimasi,

dengan mengurangi tekanan ruang dan memulai sublimasi es dengan meningkatkan suhu rak pada tingkat yang terkendali.

- *Pengeringan sekunder (desorpsi)*: Setelah pengeringan primer, sejumlah besar (15 – 20%) air yang tidak beku tetap berada dalam produk yang kemudian dilepaskan dalam pengeringan sekunder dengan mengubah tekanan dan suhu ruang.

Metode pengeringan beku sering diterapkan untuk mempertahankan viabilitas sel probiotik dalam penyimpanan jangka panjang, karena mampu mencegah terjadinya transisi fase air dan proses oksidasi (Rajam & Subramanian, 2022). Kerusakan yang disebabkan oleh suhu rendah dan sublimasi air selama proses pengeringan beku terhadap mikroorganisme relatif kecil dibandingkan dengan suhu tinggi yang digunakan dalam pengeringan semprot (Sun et al., 2023). Penelitian oleh Rodrigues et al. (2020) menunjukkan pengurangan viabilitas probiotik hasil pengeringan beku dengan Fruktooligosakarida dan gum Arab sebagai agen enkapsulasinya. *Lactobacilli* berkurang sebesar 21,32%, *Enterococci* sebesar 21,18%, dan khamir sebesar 19,02%. Secara keseluruhan, probiotik menunjukkan hasil viabilitas terbaik >79%. Meskipun demikian, sel bakteri tetap berisiko mengalami inaktivasi, terutama pada fase pembekuan. Pada tahap ini, pembentukan kristal es dapat memicu tekanan besar dan dapat merusak struktur dinding sel. Untuk meminimalkan kerusakan selama proses pembekuan maupun pengeringan, ditambahkan bahan pelindung atau krioprotektan yang berfungsi menjaga stabilitas dan integritas sel (Koh et al., 2022).

1.2.8 Bahan Penyalut untuk Konservasi Bakteri Asam Laktat

Pemilihan bahan penyalut dalam konservasi probiotik memegang peranan penting karena bahan tersebut harus memenuhi standar pangan, ramah lingkungan (biodegradable), serta mampu membentuk penghalang fisik yang efektif antara inti sel probiotik dan lingkungannya (Vivek et al., 2023). Kriteria utama dalam pemilihan bahan penyalut atau bahan dinding umumnya meliputi kemampuannya dalam mempertahankan viabilitas sel selama proses produksi dan penyimpanan jangka panjang. Selain itu faktor seperti kelarutan, berat molekul, kemampuan membentuk film, serta sifat pengemulsi juga menjadi pertimbangan penting (Rodrigues et al., 2020).

Berbagai jenis biopolimer dapat digunakan sebagai bahan penyalut, seperti eksudat tumbuhan (gum Arab), ekstrak laut (alginat, karagenan), protein (protein susu atau whey, skim milk, protein kedelai, gelatin, gluten), serat makanan (pati resisten, pati jagung, pati singkong), glukosa (laktosa, sukrosa, trehalosa, maltodekstrin), serta polisakarida mikroba dan hewan (kitosan, xanthan). Efisiensi enkapsulasi, karakteristik fisiko-kimia, dan stabilitas mikrokapsul sangat bergantung pada komposisi bahan pelindung (Singh et al., 2022). Adapun biopolimer yang paling umum digunakan sebagai bahan penyalut bakteri probiotik sebagai berikut.

a. Gum Arab

Gum Arab juga dikenal sebagai gum akasia, merupakan polisakarida alami dari pohon akasia yang bersifat larut dalam air, memiliki kemampuan membentuk film, serta berfungsi sebagai penstabil dan pengemulsi (Koh et al., 2022). Sifat-sifat ini menjadikannya kandidat potensial sebagai bahan pelindung dalam konservasi probiotik. Pada proses pengeringan beku, gum Arab dapat membentuk matriks pelindung di sekitar sel probiotik baik itu selama proses pembekuan ataupun pengeringan, membantu menjaga integritas membran sel dan mencegah kerusakan akibat pembentukan kristal es. Selain itu, gum Arab memiliki sifat prebiotik karena dapat difermentasi oleh bakteri probiotik, mendukung pertumbuhan dan aktivitasnya setelah rehidrasi (Ma et al., 2021).

Gum Arab cenderung menghasilkan mikrokapsul dengan bentuk tidak beraturan dan permukaan kasar, yang dapat mengurangi kemampuan untuk mempertahankan probiotik. Gum Arab juga merupakan bahan yang relatif mahal karena sering terjadi kekurangan pasokan. Oleh karena itu, gum Arab digunakan bersama dengan biomaterial lain seperti maltodekstrin, gelatin, dan protein whey. Penggunaan gum Arab dalam kombinasi dengan maltodekstrin terbukti memberikan perlindungan dengan daya tahan probiotik 71,0%, yang lebih baik terhadap probiotik selama penyimpanan 10 minggu dibanding jika hanya menggunakan gum Arab yang daya tahan probiotiknya 35,3% atau maltodekstrin yang daya tahan probiotiknya 30,2% (Ramos et al., 2018).

b. Maltodekstrin

Maltodekstrin adalah polisakarida yang diperoleh dari hidrolisis pati nabati seperti dari jagung, beras, kentang atau gandum. Maltodekstrin sering digunakan karena ketersediaannya yang mudah didapatkan, murah, tidak beracun, memiliki molekul rendah hingga sedang, bersifat larut dalam air, dan menunjukkan stabilitas termal yang baik. Sifat-sifat ini menjadikannya bahan pelapis yang ideal dalam proses enkapsulasi mikroorganisme, termasuk bakteri probiotik. Kemampuannya dalam membentuk matriks kaca mencegah penggumpalan dan memudahkan dalam proses enkapsulasi. Maltodekstrin juga memiliki sifat prebiotik sedang dan bermanfaat dalam enkapsulasi probiotik (Koh et al., 2022).

Namun, maltodekstrin memiliki kapasitas pengemulsi yang lemah. Oleh karena itu, ia menunjukkan efisiensi enkapsulasi yang rendah. Dalam hal ini, maltodekstrin sering digunakan bersama dengan biomaterial lain seperti gum Arab dan natrium kaseinat. Penelitian oleh Costa et al. (2023) menunjukkan bahwa penggunaan maltodekstrin dikombinasikan dengan tepung ubi jalar, pektin, dan gelatin untuk mikroenkapsulasi *Lactiplantibacillus Plantarum*, menunjukkan ketahanan termal >59% dan kelangsungan hidup dalam kondisi asam >80%. *L. Plantarum* juga tetap hidup selama 45 hari pada suhu 8°C dan -18°C. Penggunaan maltodekstrin dengan krioprotektan lain dapat memberikan perlindungan tambahan terhadap sel probiotik. Kombinasi ini memanfaatkan sifat pelindung masing-masing bahan untuk meningkatkan stabilitas dan viabilitas probiotik.

c. Skim Milk

Skim milk merupakan salah satu produk susu dengan kadar lemak yang rendah, yaitu 0,6–1,25%. *Skim milk* sering digunakan sebagai krioprotektan karena kandungan proteinnya terutama kasein dan whey protein, yang dapat membentuk lapisan pelindung di sekitar sel bakteri. Lapisan ini membantu menjaga integritas sel, mengurangi laju penurunan suhu, dan mencegah kerusakan selama proses pembekuan maupun pengeringan. Komponen protein pada skim milk yang paling penting adalah kasein. Kasein menyusun 76–86% dari total protein *skim milk* (Ibrahim et al., 2023). Komponen lain dalam *skim milk* seperti kalsium, dapat berperan dalam meningkatkan ketahanan termal sel bakteri (Jouppila et al., 1997).

Menggabungkan *skim milk* dengan krioprotektan lain, seperti trehalosa atau laktosa, dapat meningkatkan efektivitas perlindungan. Meskipun demikian, penggunaan *skim milk* tanpa penggabungan krioprotektan lain juga dapat meningkatkan perlindungan dan memungkinkan masa simpan yang lama dari kultur bakteri kering yang sangat terkonsentrasi. Penelitian oleh Ibrahim et al. (2023) menunjukkan bahwa penggunaan *skim milk* saja sebagai ekspien, terbukti efektif dalam mencapai tingkat kelangsungan hidup bakteri probiotik >50% dengan jangka waktu penyimpanan 4 minggu setelah pengeringan beku. Selain itu, konsentrasi *skim milk* juga berpengaruh terhadap meningkatnya viabilitas bakteri selama penyimpanan. Konsentrasi optimal *skim milk* dapat berkisar antara 10% – 20% (Sumanti et al., 2016).

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menganalisis kemampuan tumbuh isolat BAL dari ayam kampung *Gallus domesticus* dan itik betina *Anas domesticus*, setelah melalui proses konservasi menggunakan bahan penyalut *skim milk*.
2. Menentukan waktu generasi isolat BAL dari ayam kampung *Gallus domesticus* dan itik betina *Anas domesticus*, setelah konservasi dengan bahan penyalut *skim milk*, sebagai indikator laju pertumbuhan sel bakteri.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah mengenai kemampuan tumbuh isolat BAL dari ayam kampung *Gallus domesticus* dan itik betina *Anas domesticus*, setelah melalui proses konservasi menggunakan bahan penyalut *skim milk*, serta menyediakan informasi mengenai waktu generasi BAL setelah konservasi, yang dapat digunakan sebagai parameter untuk mengevaluasi laju pertumbuhan dan aktivitas metabolik bakteri.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2025 hingga Juli 2025, bertempat di Laboratorium Biologi Terpadu dan Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdapat tiga jenis alat diantaranya alat gelas (gelas kimia, gelas ukur, pipet ukur, cawan petri, cawan petri steril, erlenmeyer, tabung reaksi, batang pengaduk, kaca preparat, botol kaca), alat non gelas (ose bulat, ose lurus, spoit, tabung sentrifus, pipet tetes, labu semprot, gegep, bunsen, spatula, rak tabung reaksi, sendok tanduk), alat instrumen (alat liofilisator, spektrofotometer, shaker rotator, mikroskop, sentrifus, vortex, timbangan digital, Laminar Air Flow (LAF), lemari pendingin, hot plate, inkubator, oven, pH meter), dan alat non instrumen yaitu enkas dan autoklaf.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu isolat bakteri probiotik PATA-5 dan isolat bakteri probiotik PRIB-3, *Skim Milk* 20%, *Skim Milk* 10%, media selektif MRSB (*de Mann Rogosa Sharpe Broth*), media selektif MRSA (*de Mann Rogosa Sharpe Agar*), media NA (*Nutrient Agar*), media TSIA (*Tripel Sugar Iron Agar*), media SIM (*Sulfid Indol Motility*), media MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*), CaCO_3 , KOH 40%, alfanaptol, metil-red, pewarna gram (Kristal Violet, Iodin, Alkohol-Aseton, dan Safranin), Ciprofloxacin, *blank disk*, alkohol 70%, aquades, HCl 0,1 N, gara, garam empedu, minyak imersi, kapas, pencadang, aluminium foil, *cling wrap*, plastik steril, dan label.

2.3 Prosedur Kerja

2.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

2.3.1.1 Metode Panas Kering

Sterilisasi dengan metode panas kering dilakukan dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Metode panas kering digunakan untuk mensterilkan alat-alat gelas seperti erlenmeyer, cawan petri, dan tabung reaksi.

2.3.1.2 Metode Panas Membara

Sterilisasi dengan metode panas membara dilakukan dengan menggunakan api bunsen. Metode panas membara digunakan untuk mensterilkan alat berupa

jarum ose. Sterilisasi dilakukan dengan cara jarum ose dilidapkan di atas nyala api bunsen hingga merah membara.

2.3.1.3 Metode Panas Basah

Sterilisasi dengan metode panas basah dilakukan dengan menggunakan autoklaf yang dilengkapi dengan katup pengaman, pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm. Metode panas basah digunakan untuk mensterilkan alat dan bahan. Sterilisasi alat dan bahan dilakukan selama 15 menit.

2.3.2 Pembuatan Media

2.3.2.1 Media MRSA (*de Mann Rogosa Sharpe Agar*)

Sebanyak 6,2 gram media MRSA dan CaCO_3 1% dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, kemudian dipanaskan dan diaduk sampai homogen. Media yang sudah homogen disterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.2.2 Media MRSB (*de Mann Rogosa Sharpe Broth*)

Sebanyak 5,2 gram media MRSB dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, kemudian diaduk sampai homogen. Media yang sudah homogen disterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.2.3 Media NA (*Nutrient Agar*)

Sebanyak 2 gram media NA dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, kemudian dipanaskan dan diaduk sampai homogen. Media yang sudah homogen disterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.2.4 Media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Sebanyak 6,5 gram media TSIA dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, kemudian dipanaskan dan diaduk sampai homogen. Media yang sudah homogen dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 7 mL, selanjutnya disterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.2.5 Media SIM (*Sulfid Indole Motility*)

Sebanyak 3 gram media SIM dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, kemudian dipanaskan dan diaduk sampai homogen. Media yang sudah homogen dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 3 mL, selanjutnya

disterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰ C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.2.6 Media MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*)

Sebanyak 1,7 gram media MR-VP dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, kemudian dipanaskan dan diaduk sampai homogen. Media yang sudah homogen dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 5 mL, selanjutnya disterilisasi secara panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰ C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.3 Sampel Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri probiotik yang diperoleh dari koleksi kultur Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Universitas Hasanuddin, yang telah diisolasi dan dikarakterisasi oleh Riska (2024) dan Husain et al. (2020). Berdasarkan hasil isolasi dan karakterisasi tersebut, diperoleh bakteri dengan kode isolat PRIB-3 (Riska, 2024) merupakan bakteri probiotik hasil isolasi dari saluran pencernaan itik betina *Anas domesticus*, dan bakteri dengan kode isolat PATA-5 (Husain et al., 2020) merupakan bakteri probiotik hasil isolasi dari saluran pencernaan ayam kampung *Gallus domesticu* yang diperoleh dari daerah asal Takalar, Sulawesi Selatan.

2.3.4 Peremajaan Bakteri Asam Laktat

Peremajaan bakteri dilakukan dengan diinokulasikan isolat bakteri PRIB-3 dan PATA-5 sebanyak 1 mL ke dalam erlenmeyer yang berisi media MRSB 50 mL, masing-masing 1 erlenmeyer untuk setiap bakteri. Selanjutnya, media yang berisi bakteri dishaker pada suhu ruang selama 24 jam. Pertumbuhan isolat bakteri ditandai dengan adanya perubahan warna media menjadi keruh. Peremajaan bertujuan untuk mengaktivasi isolat bakteri dan mengoptimalkan pertumbuhan bakteri tersebut.

2.3.5 Pengujian Kemurnian Bakteri Asam Laktat

Pengujian kemurnian dimulai dengan menumbuhkan isolat aktif hasil peremajaan kultur pada media MRSA. Pengujian kemurnian dilakukan dengan diinokulasikan isolat bakteri PATA-5 dan PRIB-3 ke dalam cawan petri yang berisi media MRSA dengan teknik *quadrant streak*, masing-masing 1 cawan petri untuk setiap bakteri. Selanjutnya, media yang berisi bakteri diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu 37⁰ C selama 24 jam. Tahap pemurnian dapat dilakukan beberapa kali hingga diperoleh koloni bakteri yang benar-benar murni yang ditandai dengan adanya koloni terpisah dan terbentuknya zona bening di sekitar koloni.

2.3.6 Pembuatan Stok Kultur Bakteri Asam Laktat

Isolat bakteri PRIB-3 dan PATA-5 yang telah diuji kemurniannya, ditumbuhkan ulang pada media MRSB sebagai stok kultur. Pembuatan stok kultur dilakukan dengan diinokulasikan masing-masing isolat murni PRIB-3 dan PATA-5 pada media MRSB sebanyak 3 mL dengan perbandingan isolat bakteri dan media 1:1. Selanjutnya, stok kultur disimpan dalam kulkas penyimpanan untuk kemudian dapat digunakan pada uji-uji selanjutnya.

2.3.7 Pengamatan Morfologi Bakteri Asam Laktat

2.3.7.1 Pengamatan Morfologi Koloni

Setelah dilakukan pengujian kemurnian, setiap koloni bakteri PRIB-3 dan PATA-5 yang tumbuh diamati morfologinya. Pengamatan morfologi koloni dilakukan dengan mengamati secara langsung di bawah mikroskop stereo dengan perbesaran 1000. Adapun hal-hal yang diamati meliputi bentuk koloni (shape), bentuk tepian (margin), warna (colour), dan permukaan koloni (elevation).

2.3.7.2 Pengamatan Morfologi Sel

Pengamatan morfologi sel bakteri dilakukan dengan melakukan teknik pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram diawali dengan dibuat ulasan bakteri pada permukaan kaca preparat menggunakan ose bulat, lalu dilakukan proses fiksasi menggunakan bunsen. Kemudian, sebanyak 2-3 tetes Gram A (kristal violet) ditetaskan pada ulasan bakteri yang berada pada permukaan kaca preparat dan didiamkan selama 60 detik. Kaca preparat kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya, sebanyak 2-3 tetes Gram B (larutan iodine) ditetaskan pada ulasan bakteri yang berada pada permukaan kaca preparat dan didiamkan selama 60 detik. Kaca preparat kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Ulasan bakteri pada permukaan kaca preparat selanjutnya ditambahkan 2-3 tetes larutan alkohol-aseton dan didiamkan selama 30 detik. Kaca preparat kemudian dicuci menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu, sebanyak 2-3 tetes larutan safranin ditetaskan pada preparat dan didiamkan selama 30 detik. Kaca preparat kemudian dicuci menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Terakhir, diamati di bawah mikroskop yang terlebih dahulu telah ditambahkan minyak imersi. Hasil pewarnaan bakteri Gram positif ditandai dengan koloni berwarna ungu, dan bakteri Gram negatif ditandai dengan koloni berwarna merah.

2.3.8 Uji Fisiologis Bakteri Asam Laktat

2.3.8.1 Uji Ketahanan Terhadap Keasaman Lambung (pH)

Uji ketahanan terhadap asam lambung (pH) dilakukan dengan menggunakan media MRSB dengan penambahan HCl 0,1 N untuk mendapatkan pH 2,5 sesuai dengan pH lambung pada ayam ataupun itik. Sebanyak 1 mL kultur bakteri

yang diambil dari stok kultur diinokulasikan pada media MRSB + HCl 0,1 N, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya endapan yang terbentuk pada tabung reaksi, dan warna media menjadi keruh.

2.3.8.2 Uji Ketahanan Terhadap Garam Empedu

Uji ketahanan terhadap garam empedu dilakukan dengan menggunakan media MRSB dengan penambahan garam empedu dengan konsentrasi 1% dan 5%. Kemudian sebanyak 1 mL kultur bakteri yang diambil dari stok kultur diinokulasikan pada media MRSB + garam empedu 1% dan 5%. Dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya endapan yang terbentuk pada tabung reaksi, dan warna media menjadi keruh.

2.3.8.3 Uji Ketahanan Terhadap Temperatur (Suhu)

Diinokulasikan sebanyak 1 mL kultur bakteri yang diambil dari stok kultur ke dalam media MRSB dalam tabung reaksi. Dilakukan inkubasi pada suhu 15°C, 37°C, dan 45°C selama 2x24 jam. Hasil positif apabila warna media menjadi keruh, yangandakan terjadinya pertumbuhan bakteri pada media.

2.3.9 Uji Biokimia Bakteri Probiotik

2.3.9.1 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 2x24 jam. Adapun perubahan yang dapat teramati setelah dilakukan inkubasi yaitu warna media yang menjadi kuning menandakan media pada suasana asam, sedangkan warna merah pada media menandakan media pada suasana basa, dan terbentuknya warna hitam menandakan terbentuknya H₂S. Selain itu, yang menandakan jika positif memproduksi gas dapat teramati ketika media terangkat.

2.3.9.2 Uji SIM (Sulfid Indol Motility)

Diinokulasikan sebanyak 1 ose isolat bakteri yang diambil dari stok kultur ke dalam media SIM dengan metode tusuk tegak. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 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 isolat bakteri melakukan pergerakan (motil). Adapun untuk hasil negatif ditandai dengan 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).

2.3.9.3 Uji MR-VP

1) Uji MR

Diinokulasikan pada media MR-VP isolat yang diambil dari stok kultur sebanyak 0,5 mL lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 5x24 jam. Selanjutnya, ditambahkan sebanyak 5 tetes methyl red pada media yang telah diinkubasi. 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) Uji VP

Diinokulasikan pada media MR-VP isolat yang diambil dari stok kultur sebanyak 0,5 mL lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 3x24 jam. Setelah itu, media kemudian ditambahkan 0,2 mL KOH 40% dan 0,6 alfa naptol dan dihomogenkan selama 30 detik. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya kompleks warna lembayung pada media.

2.3.9.4 Uji Katalase

Diinokulasikan sebanyak 0,1 mL isolat bakteri yang diambil dari stok kultur pada kaca preparat, lalu ditetesi dengan reagen H_2O_2 (hidrogen peroksida). Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung gas yang terbentuk, sedangkan hasil negatif ketika tidak terbentuk gelembung gas.

2.3.10 Pengukuran Kurva Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat

Pengukuran kurva pertumbuhan dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui waktu panen pada saat produksi biomassa yang paling optimal dan memiliki kualitas baik untuk tahapan konservasi. Bakteri dengan produksi biomassa optimal dapat diperoleh pada fase logaritma.

2.3.10.1 Pra Kultur

Diinokulasikan sebanyak 1 mL masing-masing isolat bakteri PRIB3 dan PATA5 yang diambil dari stok kultur ke dalam media MRSB 50 mL kemudian dishaker selama 24 jam pada suhu ruang. Pra kultur bertujuan untuk meremajakan isolat bakteri yang diperoleh dari stok kultur.

2.3.10.2 Kultur

Diinokulasikan sebanyak 1 mL masing-masing kultur bakteri PRIB3 dan PATA5 yang diperoleh dari hasil pra kultur ke dalam media MRSB 150 mL kemudian dishaker selama 24 jam pada suhu ruang. Dilakukan pengukuran pada awal inkubasi T_0 menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm (λ 580 nm). Dikalibrasi alat spektrofotometer menggunakan blanko. Setelah itu, sebanyak 5 mL

suspensi bakteri dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil. Setelah dikalibrasi, dimasukkan tabung reaksi kecil yang berisi suspensi bakteri ke dalam spektrofotometer untuk mengukur OD (*Optical Density*). Dilanjutkan pengukuran dengan interval waktu 1,5 jam selama 24 jam untuk menghitung tingkat pertumbuhannya. Dilakukan pengukuran sampai hasilnya mendapatkan minimal dua kali nilai transmittan yang sama.

2.3.11 Uji Daya Hambat

2.3.11.1 Penyiapan Bakteri Uji

Digunakan bakteri uji yaitu *Staphylococcus aureus* sebagai golongan bakteri gram positif dan *Escherichia coli* sebagai bakteri gram negatif. Bakteri uji tersebut diremajakan terlebih dahulu pada media NA miring menggunakan teknik gores yang selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, dibuat suspensi bakteri uji dengan mengambil isolat bakteri uji yang telah diremajakan untuk diinokulasikan pada aquades steril dan dihomogenkan menggunakan vortex.

2.3.11.2 Penyiapan Kultur Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat yang digunakan adalah isolat BAL PRIB-3 dan PATA-5 yang dipanen pada jam ke-7 berdasarkan kurva pertumbuhan. Dilakukan pengambilan masing-masing inokulum bakteri PRIB-3 dan PATA-5 sebanyak 15 mL. Kemudian, inokulum bakteri disentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit, untuk memisahkan supernatan dengan biomassa sel bakteri.

2.3.11.3 Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri Patogen

Uji daya hambat dilakukan menggunakan isolat BAL PRIB-3 dan PATA-5 sebelum proses penyimpanan atau konservasi. Daya hambat isolat BAL PRIB-3 dan PATA-5 dibandingkan dengan ciprofloxacin sebagai kontrol positif. Uji daya hambat dilakukan dengan metode difusi menggunakan *blank disk* berukuran 6 mm. Sebanyak 1 mL isolat *S. aureus* dan *E. coli* diinokulasikan pada media NA dengan metode tuang (*pour plate*) dan ditunggu hingga memadat. Sementara itu, *blank disk* steril direndam ke dalam masing-masing supernatan isolat BAL PRIB-3 dan PATA-5, dan larutan ciprofloxacin selama 15-20 menit. Setelah itu, *blank disk* diletakkan pada permukaan media NA yang telah memadat, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Diameter zona bening yang terbentuk (mm) diukur menggunakan jangka sorong.

2.3.12 Konservasi Bakteri Asam Laktat

2.3.12.1 Penyiapan Kultur Bakteri

Diinokulasikan sebanyak 1 mL kultur BAL PRIB3 dan PATA5 ke dalam masing-masing media MRSB 50 mL, kemudian dishaker selama 6 jam pada suhu ruang. Setelah itu, ditumbuhkan kembali sebanyak 1,5 mL inokulum pada media

MRSB 150 mL kemudian dishaker selama 4,5 jam. Selanjutnya, dilakukan pengambilan inokulum bakteri sebanyak 3 kali setiap interval waktu 30 menit, masing-masing 15 mL dalam sekali pengambilan inokulum. Kemudian, inokulum bakteri disentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit.

2.3.12.2 Pembuatan Bahan Penyalut

Ditimbang serbuk *skim milk* dengan konsentrasi pada *skim milk* yaitu 10% dan 20%. Diambil masing-masing sebanyak 10 gram dan 20 gram *skim milk* dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 100 mL, lalu dipasteurisasi selama 20 menit dengan suhu 90° C.

2.3.12.3 Penyalutan Bakteri

Inokulum bakteri yang telah disentrifuge dibuang bagian supernatannya, lalu dibagian biomassa sel ditambahkan dengan akuades sebanyak 5 mL kemudian divortex, lalu dimasukkan ke bahan penyalut dan dihomogenkan. Setelah itu, inokulum bakteri yang telah dicampur dengan bahan penyalut dituang ke cawan petri steril, kemudian dimasukkan ke dalam freezer untuk tahapan pembekuan.

2.3.12.4 Liofilisasi

Inokulum bakteri yang telah disalut menggunakan bahan penyalut *skim milk* dimasukkan ke dalam freezer dan dibekukan pada suhu -2°C selama 24 jam. Setelah proses pembekuan, dilanjutkan dengan proses pengeringan menggunakan alat pengeringan beku BIOBASE dari Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Universitas Hasanuddin. Proses pengeringan dilakukan selama 49 jam sampai suhu mencapai 25°C atau suhu ruang yang menandakan inokulum bakteri telah kering.

2.3.12.5 Penyimpanan Bakteri

Bakteri salut yang telah diliofilisasi dikemas dalam botol kaca gelap, kemudian dibungkus dengan kantong plastik hitam. Setelah itu, dilakukan penyimpanan pada suhu ruang, dengan jangka waktu penyimpanan selama 1 minggu.

2.3.13 Uji Viabilitas

2.3.13.1 Persiapan Kultur Bakteri Asam Laktat

Dilarutkan sebanyak 1 gram masing-masing bubuk bakteri PRIB3 dan PATA5 dalam 9 mL aquades steril kemudian divortex untuk memperoleh larutan yang homogen, kemudian diambil sebanyak 1 mL sampel yang telah dilarutkan ditambahkan ke dalam media MRSB 50 mL kemudian dishaker pada suhu ruang selama 24 jam.

2.3.13.2 Pengukuran Kurva Pertumbuhan

Pengukuran kurva pertumbuhan ditentukan menggunakan spektrofotometer untuk penghitungan daya tahan sel yang hidup pada panjang gelombang 580 nm (OD_{580}). Diinokulasikan sebanyak 1 mL kultur bakteri yang diperoleh dari hasil persiapan kultur ke dalam media MRSB 150 mL kemudian dishaker selama 24 jam pada suhu ruang. Dilakukan pengukuran pada awal inkubasi T_0 menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm (λ 580 nm). Dikalibrasi alat spektrofotometer menggunakan blanko. Setelah itu, sebanyak 5 mL suspensi bakteri dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil. Setelah dikalibrasi, dimasukkan tabung reaksi kecil yang berisi suspensi bakteri ke dalam spektrofotometer untuk mengukur kepadatan optik (OD). Dilanjutkan pengukuran dengan interval waktu 1,5 jam selama 24 jam untuk menghitung tingkat pertumbuhannya. Dilakukan pengukuran sampai hasilnya mendapatkan minimal dua kali nilai transmittan yang sama.

2.3.13.3 Uji Daya Hambat

2.3.13.3.1 Penyiapan Bakteri Uji

Digunakan bakteri uji yaitu *Staphylococcus aureus* sebagai golongan bakteri gram positif dan *Escherichia coli* sebagai bakteri gram negatif. Bakteri uji tersebut diremajakan terlebih dahulu pada media NA miring menggunakan teknik gores yang selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, dibuat suspensi bakteri uji dengan mengambil isolat bakteri uji yang telah diremajakan untuk diinokulasikan pada aquades steril dan dihomogenkan menggunakan vortex.

2.3.13.3.2 Penyiapan Kultur Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat yang digunakan adalah liofilisat isolat BAL PRIB-3 dan PATA-5 yang dipanen pada jam ke-10 berdasarkan kurva pertumbuhan. Dilakukan pengambilan masing-masing inokulum bakteri PRIB-3 dan PATA-5 sebanyak 15 mL. Kemudian, inokulum bakteri disentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit, untuk memisahkan supernatan dengan biomassa sel bakteri.

2.3.13.3.3 Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri Patogen

Uji daya hambat dilakukan menggunakan liofilisat isolat BAL PRIB-3 dan PATA-5 setelah proses penyimpanan atau konservasi. Daya hambat liofilisat isolat BAL PRIB-3 dan PATA-5 dibandingkan dengan ciprofloxacin sebagai kontrol positif. Uji daya hambat dilakukan dengan metode difusi menggunakan *blank disk* berukuran 6 mm. Sebanyak 1 mL isolat *S. aureus* dan *E. coli* diinokulasikan pada media NA dengan metode tuang (*pour plate*) dan ditunggu hingga memadat. Sementara itu, *blank disk* steril direndam ke dalam masing-masing supernatan liofilisat isolat BAL PRIB-3 dan PATA-5, dan larutan ciprofloxacin selama 15-20 menit. Setelah itu, *blank disk* diletakkan pada permukaan media NA yang telah memadat, kemudian

diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Diameter zona bening yang terbentuk (mm) diukur menggunakan jangka sorong.

2.3.13 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan kurva pertumbuhan bakteri dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan nilai Optical Density (OD=580 nm) dari masing-masing isolat sebelum dan setelah proses konservasi. Perbandingan ini bertujuan untuk mengevaluasi viabilitas isolat BAL PRIB-3 dan PATA-5 setelah konservasi melalui metode liofilisasi dengan bahan penyalut skim milk 20%. Sementara itu, data uji daya hambat dianalisis secara kuantitatif berdasarkan pengukuran diameter zona bening (dalam satuan mm) terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil dari isolat diuji dan dibandingkan dengan masing-masing isolat sebelum dan setelah proses konservasi, untuk mengetahui efektivitas antimikroba yang dimiliki BAL setelah dikonservasi.

Keseluruhan data disajikan dalam bentuk tabel dan grafik untuk memberikan visualisasi terhadap kurva pertumbuhan dan aktivitas antimikroba. Analisis bersifat kualitatif dan kuantitatif sederhana, tanpa menggunakan uji statistik, karena fokus utama penelitian ini adalah untuk mengetahui pertumbuhan dan perbandingan viabilitas sebelum dan sesudah proses konservasi.