

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kebutuhan susu di Indonesia semakin meningkat seiring dengan kesadaran masyarakat akan pentingnya nutrisi dari susu. Susu merupakan cairan yang berasal dari ambung ternak perah yang sehat dan bersih yang diperoleh dengan cara pemerahan yang baik dan benar sesuai dengan ketentuan yang berlaku dan kandungan pada susu tidak dikurangi atau ditambah dengan sesuatu serta belum mendapat perlakuan apapun, kecuali adanya proses pendinginan pada susu yakni untuk menjaga dan mempertahankan kualitas dari susu tersebut. Hingga saat ini hewan ternak yang paling dominan penghasil susu adalah sapi perah, padahal selain sapi perah, ternak mamalia lainnya seperti kerbau, kambing dan kuda juga mampu menghasilkan susu meski proporsinya sangat kecil. Kebutuhan susu nasional diperhitungkan mencapai 4,4 juta ton atau 11 ton per hari. Sementara dari data BPS menunjukkan hasil produksi susu nasional baru mencapai 968.980 ton di tahun 2022 yang dihasilkan oleh 569,43 ribu ekor sapi. Kondisi tersebut menunjukkan produksi susu sapi perah belum dapat mencukupi kebutuhan susu nasional (BPS 2022).

Kambing perah merupakan salah satu alternatif penghasil susu selain sapi perah. Sifat-sifat yang menguntungkan pada ternak kambing, di antara lain kemampuan beradaptasi pada wilayah geografis dan kondisi iklim yang sangat bervariasi, menjadikan ternak ini dapat dikembangkan di daerah yang tidak subur. Populasi kambing di Indonesia pada tahun 2015 terjadi peningkatan 2% yaitu mencapai 19.012.794 ekor (Dirjen Peternakan dan Kesehatan Hewan, 2016). Menurut *Food and Agriculture Organization* (FAO) menempati peringkat ke-7 dalam daftar produksi susu kambing global dan sebagai peringkat ke-1 di kawasan Asia Tenggara pada tahun 2009. Produksi susu kambing di Indonesia pada tahun tersebut sebanyak 238.000 ton (Prihanani *et al.*, 2020). Perkembangan ini terjadi akibat adanya susu kambing yang diyakini memiliki banyak khasiat seperti kecernaannya yang tinggi, alergenitas yang rendah dan komposisi kimia bermanfaat, lebih mirip dengan susu manusia dibandingkan susu sapi. Susu kambing dapat menjadi salah satu susu alternatif selain susu sapi yang saat ini menjadi susu komersial.

Salah satu kambing yang terkenal di Indonesia adalah kambing Peranakan Etawa (PE) karena merupakan ternak dwiguna yaitu sebagai penghasil susu dan daging. Kambing Peranakan Etawah (PE) merupakan kambing hasil persilangan antara kambing kacang atau kambing jawarandu dan kambing etawah. Bobot badan kambing Peranakan Etawa berkisar 32-37 kg dengan produksi susu kambing peranakan etawa berkisar 1,5-3 L/ hari. Kambing PE memiliki pertumbuhan yang cepat dan *litter size* mencapai 2 ekor serta dapat beranak tiga kali dalam dua tahun. Pemeliharaan kambing tersebut juga mudah dan tidak membutuhkan lahan yang luas serta sangat adaptif dengan topografi di Indonesia (Ratya *et al.*, 2017).

Di Indonesia, hampir 90% kambing dipelihara untuk tujuan menghasilkan daging. Tentunya, kenyataan ini sangat ironis dengan fakta bahwa di negeri ini populasi peranakan kambing etawa termasuk terbesar di dunia, dan seperti diketahui kambing etawa adalah kambing penghasil susu yang cukup potensial. Di luar negeri, seperti di India, kambing etawa juga dipelihara sebagai penghasil susu yang produktif. Rata-rata produksinya adalah 235 kg per masa laktasi (261 hari). Produksi susu kambing memberikan sumbangan sebesar 35% terhadap produksi susu di dunia (Sodiq dan Abidin, 2008). Padahal susu kambing memiliki beberapa keunggulan jika dibandingkan dengan susu sapi, diantaranya susu kambing memiliki warna yang lebih putih dan jumlah globula lemaknya yang lebih kecil. Oleh karena itu, lemak susu kambing lebih mudah dicerna dan dapat diminum oleh orang yang memiliki alergi terhadap susu sapi, *lactose intolerance*, atau masalah pencernaan lainnya. Selain itu, susu kambing memiliki sifat antiseptik alami yang dapat menekan pertumbuhan bakteri dalam tubuh dan tidak menyebabkan diare. Susu kambing dikenal sebagai salah satu minuman yang membantu dalam terapi kesehatan. Salah satu contoh sifat fungsional ini adalah susu yang tidak menyebabkan alergi dan meningkatkan serapan vitamin larut lemak. Adapun, susu kambing mengandung zat gizi yang tinggi, seperti: karbohidrat 4,40g/100g, protein 3,10 g/100 g, dan lemak 3,50 g/100 g. Kandungan gizi susu kambing memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai minuman fungsional untuk kesehatan salah satunya yaitu minuman probiotik (Risayani *et al.*, 2022).

Minuman probiotik merupakan minuman yang mengandung bakteri seperti bakteri asam laktat (BAL) yang menguntungkan bagi saluran pencernaan karena dapat meningkatkan keseimbangan mikroflora usus dan mampu bertahan hidup dalam keasaman lambung sehingga dapat menempati usus dalam kuantitas yang cukup besar. Diketahui juga berdasarkan hasil penelitian bahwa produk probiotik dapat menghambat bakteri patogen dan melakukan metabolisme terhadap laktosa sehingga bermanfaat bagi penderita intoleransi laktosa. Bakteri menguntungkan yang terdapat dalam produk probiotik dapat menjaga keseimbangan mikroflora dalam usus dengan menekan pertumbuhan bakteri patogen. Berdasarkan hal itu, produk konsumsi yang mengandung probiotik dapat mencegah gangguan pencernaan seperti diare, tipus, dan disentri yang sering dialami oleh masyarakat (Dewi *et al.*, 2021).

Probiotik adalah istilah yang digunakan pada mikroorganisme hidup yang dapat memberikan efek baik atau kesehatan pada organisme lain/inangnya. Karakteristik probiotik yang efektif adalah dapat dikemas bentuk hidup dalam skala industri, stabil dan hidup pada kurun waktu penyimpanan lama dan kondisi lapangan, bisa bertahan hidup di dalam usus dan menguntungkan bagi peternak. Kebanyakan bakteri probiotik berasal dari kelompok bakteri asam laktat (BAL) dan diantaranya *Lactobacillus* dan *Bifidobakteria* memiliki peran yang signifikan dalam menjaga ekosistem pencernaan dan menstimulasi sistem imun inang. Probiotik dapat berupa satu atau beberapa jenis mikroorganisme (mikroorganisme tunggal atau kultur campuran). Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan salah satu kelompok bakteri yang

banyak digunakan sebagai bakteri probiotik, akan tetapi tidak semua BAL termasuk sebagai bakteri probiotik (Permadi *et al.*, 2018).

Bakteri probiotik dapat ditemukan secara alami dalam susu kambing dan susu hewan lainnya. Semua hewan, termasuk kambing, memiliki mikrobiota alami pada saluran pencernaan, kulit, dan area tubuh lainnya. Ketika kambing diperah, beberapa mikroorganisme, termasuk bakteri probiotik, dapat terbawa dalam susu. Ini terjadi karena susu kambing sering kali mengandung bakteri dari lingkungan tempat kambing hidup, seperti rumput, air minum, dan udara sekitar. Jika susu kambing dibiarkan difermentasi atau diproses menjadi produk seperti yogurt, kefir, atau keju, mikroba didalamnya dapat berkembang biak dan bertindak sebagai probiotik. Bakteri probiotik seperti *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* sering ditambahkan atau berkembang biak selama proses fermentasi. Bakteri-bakteri ini dapat membantu mengembalikan keseimbangan mikrobiota di usus dan mendukung pencernaan yang sehat.

Susu kambing merupakan susu yang mengandung nutrisi lengkap sehingga menjadi media pertumbuhan yang ideal untuk mikroorganisme (BAL). Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri Gram positif berbentuk kokus atau batang, tidak membentuk spora, katalase negatif, tahan terhadap asam dan bersifat fakultatif anaerob. Bakteri Asam Laktat ini merupakan sekelompok besar mikroorganisme yang secara fisiologis akan menghasilkan asam laktat sebagai metabolit utamanya. Kelompok BAL ini secara alami terdapat pada banyak bahan pangan serta saluran gastrointestinal dan urogenital manusia dan hewan. Selama pertumbuhannya, BAL akan dapat memproduksi komponen metabolit, seperti asam organik, hidrogen peroksida, bakteriosin, dan komponen lainnya. Eksplorasi sumber-sumber BAL dapat dilakukan pada pangan fermentasi tradisional, seperti tauco, tempoyak, pickel, sawi asin, bekasam, dan lain-lain. Golongan bakteri fermentasi bahan makanan umumnya didominasi oleh empat genus bakteri asam laktat, yaitu golongan *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* dan *Pediococcus*. Secara umum keempat jenis ini dikelompokkan sebagai bakteri gram positif, berbentuk kokus atau batang yang tidak berspora (Kurnia *et al.*, 2020).

Menurut penelitian Octaviana *et al.*, (2023), susu kambing juga memiliki populasi BAL, sehingga isolasi dan karakterisasi BAL dari susu kambing menarik untuk dilakukan. Komposisi BAL dari susu kambing didominasi oleh *Lactobacillus* spp., namun mikrobiota susu kambing dapat bervariasi. Selain itu *Lactobacillus* spp. juga diketahui memiliki sifat probiotik yang dapat memberi manfaat kesehatan, khususnya dalam menyeimbangkan mikrobiota dalam saluran pencernaan. Menurut penelitian, manfaat kesehatan dari *Lactobacillus* spp. sebagai kandidat bakteri probiotik dikarenakan bakteri tersebut dapat memodulasi sistem kekebalan tubuh, melindungi lapisan epitel, serta memiliki efek anti-tumor. Selain itu, *Lactobacillus* spp. juga dapat dipergunakan untuk pengobatan beberapa penyakit, seperti infeksi saluran pernafasan, *bacterial vaginosis* dan *atopic dermatitis*.

Dengan mempertimbangkan manfaat kesehatan yang dapat diperoleh dari konsumsi probiotik, serta tingginya potensi susu kambing sebagai sumber bahan pangan yang kaya akan nutrisi, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan

mengkarakterisasi bakteri asam laktat dari susu kambing. Diharapkan, temuan dari penelitian ini dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan produk pangan fungsional yang lebih aman dan bermanfaat, serta membuka peluang untuk memanfaatkan bakteri asam laktat sebagai probiotik alami yang dapat mendukung kesehatan pencernaan dan sistem kekebalan tubuh.

1.2 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh isolat serta mengidentifikasi bakteri asam laktat yang bersifat sebagai probiotik dari susu kambing
2. Menentukan karakter morfologi dan fisiologi dari bakteri probiotik tersebut.

1.3 Manfaat

Penelitian ini diharapkan nantinya dapat diperoleh informasi ilmiah mengenai bakteri probiotik dan mengetahui karakter morfologi dan fisiologi dari bakteri probiotik yang terdapat dalam susu kambing.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Pelaksanaan pada bulan Februari - Juni 2025. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains Departemen Biologi, 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 alat glass (erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, objek glass, preparat, batang pengaduk, gelas ukur, gelas kimia), alat non glass (pipet tetes, jarum ose, labu semprot, rak tabung reaksi, skalpel, mortar, pastel, bunsen), alat instrumen (enkas, inkubator, oven, timbangan digital, mikroskop, hot plate, autoklaf).

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu kambing *Capra aegagrus*, air suling, alkohol 70%, medium selektif MRSA (*Mann Rogosa Sharpe Agar*), medium selektif MRSB (*Man Rogosa 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.

2.3 Cara Kerja

2.3.1 Sterilisasi Alat

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.

2.3.2 Pembuatan Medium

a. Medium MRSA (*Mann Rogosa Sharpe Agar*)

Sebanyak 6,2 g medium MRSA dan CaCO₃ 1% dilarutkan ke dalam 100 mL aquades. Kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai homogen. Disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

b. Medium MRSB (*Man Ragosa Sharpe Broth*)

Sebanyak 5,2 g medium MRSB dilarutkan ke dalam 100 mL aquades. Kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai homogen. Disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C pada tekanan 2 atm selama 15 menit.

c. Medium NA (*Nutrien Agar*)

Sebanyak 2,3 g medium NA dilarutkan ke dalam 100 mL aquades. 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

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

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

e. Medium SIM (*Sulfid Indol Motility*)

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

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

Sebanyak 0,5 gr peptone, 0,5 gr glukosa, 0,5 mL buffer fosfat, dilarutkan ke dalam 100 mL aquades. 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.

2.3.3 Pengambilan Sampel

Sampel susu kambing *Capra aegagrus* sehat di ambil dari ternak kambing yang berasal dari Pucak, kecamatan Tompobulu, kabupaten Maros. Disediakan alat-alat yang akan digunakan secara aseptis. Sebelum pemerahan, puting susu kambing disterilkan dengan menggunakan alkohol 70%. Setelah diperah, susu segera dimasukkan secara aseptis ke dalam botol steril, kemudian dimasukkan ke dalam kotak es dan dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi, Universitas Hasanuddin. Sampel tersebut selanjutnya akan di isolasi dan di karakterisasi di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Hasanuddin.

2.3.4 Isolasi Bakteri Probiotik

Sampel susu kambing *Capra aegagrus* dipipet sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan ditambahkan aquades steril sebanyak

9 ml (pengenceran 10^{-1}) dan diencerkan dengan pengenceran bertingkat (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}).

Sebanyak 1 ml larutan dari semua tingkat pengenceran masing-masing diinokulasikan pada medium MRSA yang ditambahkan CaCO_3 1%, kemudian diinkubasi selama 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 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 gelas objek 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 (pH)

Uji ketahanan terhadap asam dilakukan dengan menggunakan medium MRSB yang ditambahkan dengan HCl 2 N untuk mendapatkan pH 2-3. 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.

b. Uji Ketahanan Terhadap Garam Empedu

Medium MRSB sebanyak 9 ml yang ditambahkan dengan garam empedu dengan konsentrasi 1% dan 5% sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Selanjutnya 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 diperoleh dari perbandingan jumlah koloni bakteri yang tumbuh sebelum dan sesudah inkubasi.

2.3.9 Uji Karakteristik Biokimia

a. Uji MR (*Methyl Red*)

Sebanyak 1 ml (mikropipet) isolat 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 5 tetes methy-red ditambahkan di atas preparat isolate bakteri. Hasil positif apabila terbentuk kompleks warna merah mudah sampai merah yang menandakan bahwa mikroba tersebut menghasilkan asam.

b. Uji VP (*Voges Proskauer*)

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

c. Uji Motilitas

Sebanyak 1 ose (ose lurus) isolasi bakteri diambil dari stok kultur lalu diinokulasikan dengan cara ditusuk pada medium SIM, 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.

d. Uji Katalase

Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose (ose bulat) diulas pada preparat dan masing-masing stok kultur kemudian ditetaskan larutan reagen H₂O₂ diatas objek gelas. Hasil positif apabila terbentuk gelembung gas pada ose dan hasil negative apabila tidak terbentuk gelembung gas.

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

Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose (ose lurus) dan masing-masing stok kultur kemudian diinokulasikan dengan cara ditusuk bagian *butt* pada medium TSIA kemudian digores sinambung pada permukaan (*slant*) 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.

2.3.10 Uji Daya Hambat Terhadap Bakteri Patogen

Untuk mengetahui bahwa isolat bakteri mempunyai potensi yang bagus sebagai bakteri probiotik maka perlu dilakukan uji daya hambat terhadap bakteri patogen. Bakteri patogen yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* (bakteri gram positif) dan *Escherichia coli* (bakteri gram negatif).

Langkah awal yang perlu dilakukan adalah menginokulasi 1 ose 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 (Nutrien 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 sebar menggunakan lidi kapas steril dan didiamkan 5-10 menit agar permukaan media mengering dan meresap. 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 mengering, lalu diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37°C. Diameter zona bening yang terbentuk diukur dengan menggunakan penggaris atau jangka sorong.

2.3.11 Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat dengan Analisis Sekuensing Berbasis Gen 16S rRNA

2.3.11.1 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 1x10⁸ sel dipindahkan ke 1,5 ml tube mikrosentrifugasi, kemudian disentrifugasi dengan waktu 1 menit dengan kecepatan 14.000 rpm lalu dibuang bagian supernatan. Dimasukkan 200 µl buffer GA (buffer gram +) untuk 15 ml *centrifuge tube* dan ditambahkan 200 µl *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 µl proteinase K kemudian divortex sampai proteinase K benar-benar larut. Kemudian dimasukkan 200 µl buffer GB kedalam sampel kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Diinkubasi selama 10 menit dengan suhu 70°C untuk mendapat hasil yang homogen. Selama waktu diinkubasi

dilakukan pembalikan setiap 3 menit. Lalu, ditambahkan 200 µl 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 µl 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 µl 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 membran kering sempurna. Tempatkan *spin column* CB3 ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang baru dan pipit 50-200 µl buffer TE, kemudian diinkubasi pada suhu ruang (15-25°C) selama 2-5 menit dan disentrifugasi selama 2 menit pada 12.000 rpm. Supernatan yang tertampung pada tabung eppendorf adalah hasil dari ekstraksi DNA.

2.3.11.2 Amplifikasi DNA dengan Metode PCR

Metode kerja ini dilakukan pada sampel DNA yang telah diekstraksi. Dibuat campuran rekasi untuk PCR yaitu 8 µl 1x Mytaq HS Red Mix dan masing-masing 1 µl DNA gen 16S rRNA Primer Forward 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan primer reservasi 1387R (5'-GGGCGGTGTGTACAAGGC3') dan 2 µl dd H₂O. Setelah itu disiapkan tabung kemudian diisi dengan campuran reaksi PCR sebanyak 12 µl lalu ditambahkan 3 µl 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.

2.3.11.3 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 µl 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 µl 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.

2.3.11.4 Sekuensing DNA

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

2.3.11.5 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.

2.4 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.