

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Bakteri Asam Laktat Sebagai Probiotik

Bakteri asam laktat didefinisikan sebagai kelompok bakteri yang membentuk asam laktat, baik sebagai satu-satunya produk maupun sebagai produk utama pada metabolisme karbohidrat. Ciri-ciri bakteri asam laktat secara umum adalah selnya bereaksi positif terhadap pewarnaan Gram, bereaksi negatif terhadap katalase dan tidak membentuk spora (Buntin *et al.*, 2008). Bakteri asam laktat biasanya dibedakan menjadi beberapa cluster sesuai dengan produksi asam laktat, persentasi G+C rendah, bentuk non-spora, gram positif *basil* dan *coccus*. Bakteri asam laktat memiliki peranan penting dalam pembuatan makanan tradisional yang terfermentasi. Beberapa bakteri asam laktat sebagai kandidat probiotik dipilih berdasarkan kriteria standar, seperti resistensinya terhadap asam lambung dan asam duktus, serta aktifitas anti-mikrobal melawan bakteri patogen. (Rahayu, 2010).

Probiotik merupakan komponen dari sel mikrobial yang memiliki manfaat pada kesehatan (Marteau *et al.*, 2002). Efek menguntungkan probiotik untuk kesehatan dan sebagai asupan nutrisi pada manusia dan hewan sudah banyak dikenal oleh pakar kesehatan. Penelitian terakhir menunjukkan bahwa probiotik memegang peranan penting dalam mempertahankan sistem imun saluran pencernaan maupun saluran pernafasan. Beberapa jenis bakteri asam laktat berpotensi sebagai probiotik. Syarat yang harus dipenuhi oleh bakteri

asam laktat agar bisa digunakan sebagai probiotik adalah (1) Termasuk dalam GRAS (*Generally Recognised Used as Safe*), (2) Toleran terhadap pH asam lambung dan garam empedu, (3) Mampu menempel pada usus, membentuk koloni, memiliki aktivitas antagonis terhadap patogen, mampu mengatur sistem daya tahan tubuh, dan mempercepat penyembuhan infeksi, (4) Memproduksi senyawa antimikroba seperti asam laktat, hidrogen peroksidase, dan *bacteriosins*, dan (5) Dapat berkoagregasi (kemampuan untuk berinteraksi antar kultur untuk saling menempel) membentuk lingkungan mikroflora yang seimbang (Zubillaga *et al.*, 2001; Hai *et al.*, 2004; Yan dan Polk 2010).

## 2.2 Bakteri Asam Laktat Pada Saluran Pencernaan Orangutan

Orangutan diklasifikasikan sebagai berikut (Groves, 2010) :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrae
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Primata
Family	: Pongidae
Genus	: <i>Pongo pygmaeus</i>
Species	: <i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i> (Orangutan Kalimantan) <i>Pongo pygmaeus abelii</i> (Orangutan Sumatera)

Menurut Supriatna dan Wahyono (2000), Orangutan merupakan satu-satunya spesies kera besar yang dapat ditemukan di Asia, yang penyebarannya di Indonesia hanya terdapat di Sumatera (*Pongo abelii*) dan Kalimantan (*Pongo pygmaeus*). Studi yang dilakukan oleh Minarwanto (2008) menyebutkan bahwa kasus penyakit gangguan pencernaan seperti *enteritis*, *gastritis* dan *lactose intolerance* merupakan kasus penyakit yang sebagian besar terjadi pada orangutan. Saluran pencernaan pada orangutan terdiri dari *simple* atau *unipartite stomach*, *small intestine* yang panjang, dan *caecum* dan *colon* yang kompleks. Morfologi ini menyebabkan bagian proximal dari colon sebagai tempat penyimpanan dan fermentasi *non-starch polysaccharides*. Orangutan biasa mengonsumsi buah-buahan, daun, beberapa serangga, dan beberapa pakan yang mengandung *non-starch polysaccharides* dalam jumlah yang dapat diterima. Karbohidrat yang kompleks ini membutuhkan fermentasi dari mikrobial sebelum dapat digunakan sebagai sumber energi oleh orangutan (Caton *et al.*, 1999).

Mikrobiota ini memiliki fungsi sebagai regulator sistem imun, fungsi metabolik termasuk fermentasi karbohidrat dan sintesis dari komponen bioaktif dan fungsi perlindungan seperti menjaga integritas saluran pencernaan (Cani *et al.*, 2008; Miele *et al.*, 2009). Berdasarkan klasifikasi yang dilakukan oleh Rahayu dan Magino (1997) ada 10 genera yang termasuk dalam kelompok bakteri asam laktat, yaitu *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Lactobacillus*.

*Lactobacillus* merupakan salah satu genus bakteri asam laktat yang paling banyak dijumpai pada saluran gastro-intestinal. Pada usus halus jumlahnya dapat mencapai  $10^6 - 10^7$  sel/g, sedangkan pada usus besar jumlahnya berkisar antara  $10^{10} - 10^{11}$  sel/g (Ray, 1996).

Menurut penelitian yang dilakukan Prasthani (2012) beberapa jenis asam laktat yang dapat diisolasi dari saluran pencernaan orangutan antara lain adalah bakteri dari genus *Lactobacillus sp*, *Pedicoccus sp*, *Aerococcus sp* *Enterococcus sp*. Bakteri asam laktat hasil isolasi ini memiliki karakteristik profil protein yang sama dan mempunyai pita protein yang menunjukkan protein fungsional bakteri asam laktat sebagai probiotik yang ditunjukkan dengan memiliki sifat tahan terhadap asam lambung (pH 2,5) dan cairan garam empedu (*Oxgall* 0,3%).

### 2.3 Metode Identifikasi BAL Berdasarkan Sekuen 16s rRNA

Berbagai metode seperti *ribotyping* (Stoyancheva *et al.*, 2006), *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) untuk melihat pola dari seluruh protein dalam sel (Sánchez *et al.*, 2003; Ouadghiri *et al.*, 2005), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)-PCR (Tamang *et al.*, 2005; Mättö *et al.*, 2006), *Repetitive Element Sequence-based* (Rep)-PCR (Ouadghiri *et al.*, 2005; Tamang *et al.*, 2005), sekuensing gen rRNA (Snell-Castro *et al.*, 2005; Yin and Zheng, 2005) atau 16S-23S gen rRNA *Intergenic Spacer Region* (ISR) (Flint and Angert, 2005), *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA) (Stoyancheva *et al.*, 2006) dan *Denaturing*

*Gel Electrophoresis* (DGGE) (Montesi *et al.*, 2005) telah digunakan untuk identifikasi BAL.

Mignard *et al.*, (2006) dan Woo *et al.*, (2003) menjelaskan bahwa identifikasi bakteri berdasarkan sekuen 16s rRNA merupakan salah satu metode identifikasi yang tepat. Hasil kumulatif dari beberapa studi menyebutkan bahwa identifikasi berdasarkan sekuen 16s rRNA ini memiliki tingkat keakuratan dalam mengidentifikasi spesies bakteri sebesar 65 sampai 83% (Drancout *et al.*, 2000). Penggunaan metode identifikasi BAL berdasarkan sekuen 16s rRNA pada penelitian di laboratorium sudah menjadi hal yang biasa untuk mengidentifikasi bakteri yang belum teridentifikasi atau untuk memberikan referensi mengenai strain yang tidak biasa. Penggunaan metode 16s rRNA untuk mempelajari *phylogeny* dan *taxonomy* bakteri telah sering digunakan sebagai marker gen karena beberapa alasan termasuk (1) Sering berada pada *multigene family* atau operon semua bakteri, (2) Fungsi dari 16s rRNA yang tidak pernah berubah dari jaman ke jaman, menyajikan perubahan sekuen acak yang lebih akurat, dan (3) Gen 16s rRNA (1,500 bp) cukup besar untuk memberikan informasi (Patel, 2001).

Gen pengkode rRNA adalah gen yang mampu mempertahankan kelestariannya selama jutaan tahun keanekaragaman evolusi. Sebagian besar prokariot memiliki 3 jenis rRNA, yaitu 5S, 16S dan 23S. Penggunaan 5S rRNA juga sudah dipelajari namun gen ini terlalu kecil untuk digunakan dalam penentuan filogenetik. Gen 16S dan 23S rRNA memiliki ukuran yang cukup untuk dianalisis. Gen 16S rRNA berukuran sekitar 1500 pasang basa

dan sekitar 500 basa di bagian ujung sekuens merupakan daerah yang disebut dengan *hypervariable region*. Daerah ini merupakan bagian yang membedakan antar organisme. Primer yang digunakan dalam amplifikasi sekuens akan mengenali daerah yang lestari dan mengamplifikasi *hypervariable region*, dengan demikian akan diperoleh sekuens yang khas pada organisme tersebut (Amman *et al.*, 1995; Clarridge, 2004). Ribuan sekuens dari berbagai isolat klinis dan dari lingkungan telah terkumpul di satu database yaitu National Center for Biotechnology Information (NCBI) yang dapat diakses pada [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), serta Ribosomal Database Project yang dapat diakses di [www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html](http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html). Database ini juga menyediakan aplikasi yang dapat digunakan untuk membandingkan sekuens yang diperoleh dengan sekuens yang telah terdaftar di database tersebut (Lau *et al.*, 2002).

Salah satu contoh penggunaan metode identifikasi BAL berdasarkan sekuens 16s rRNA yang dilakukan oleh Lee *et al.*, (2008) berhasil mengidentifikasi BAL yang diisolasi dari saluran pencernaan ayam hingga ke level spesies. Pada penelitian tersebut disebutkan bahwa terdapat 14 strain *Lactobacillus* yang berhasil diidentifikasi dari saluran pencernaan ayam.

#### **2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan suatu molekul DNA target dengan mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut melalui

bantuan enzim dan oligonukleotida. Panjang target DNA berkisar antara puluhan sampai ribuan nukleotida yang posisinya diapit sepasang primer. Enzim *polymerase* merupakan enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA baru (Muladno, 2010). Molekul DNA yang direplikasi oleh enzim *DNA polymerase* mengalami penggandaan jumlah. Setiap molekul DNA ini akan direplikasi dalam siklus replikasi (*second cycle of replication*) yang menghasilkan empat kali jumlah dari molekul aslinya. Selanjutnya, setiap dari molekul-molekul tersebut direplikasi pada siklus replikasi ketiga (*third cycle of replication*). Proses ini dikenal dengan *chain reaction* dimana molekul awal DNA (*origin DNA template*) secara eksponensial diamplifikasi. PCR merupakan teknik yang mungkin digunakan untuk amplifikasi *single piece of DNA* atau jumlah molekul DNA yang sangat sedikit sehingga dihasilkan jutaan *copy* dari molekul DNA asli (Lodish, 2003).

Proses PCR merupakan proses siklus yang berulang meliputi denaturasi, annealing dan ekstensi oleh *enzim DNA polimerase*. Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk membuat hibrid dengan ujung-5' menuju ujung-3' untai DNA target dan mengamplifikasi untuk urutan yang diinginkan. **Siklus PCR** dilakukan sebanyak 30-35 kali meliputi (Fatchiyah *et al.*, 2011):

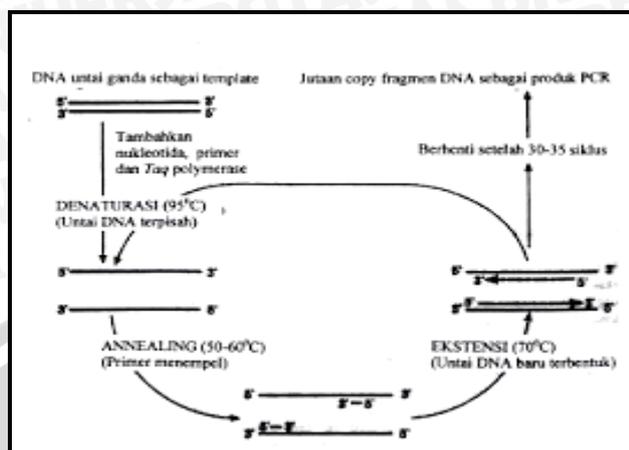
1. **Denaturation** (95°C), 30 detik. Temperatur yang tinggi pada awal proses menyebabkan pemisahan untai ganda DNA. Temperatur pada tahap denaturasi pada kisaran 92-95°C, suhu 94°C merupakan pilihan standar.

Temperatur denaturasi yang tinggi membutuhkan kandungan GC yang tinggi dari *DNA template*, tetapi *half-life* dari *Taq DNA Polymerase* menekan *secara* tajam pada temperatur sekitar 95°C.

2. **Annealing** (55–60°C), 30 detik. Pengenalan (*annealing*) suatu primer terhadap DNA target tergantung pada panjang untai, banyaknya kandungan GC, dan konsentrasi primer itu sendiri. Optimalisasi temperatur *annealing* dimulai dengan menghitung *Melting Temperature* ( $T_m$ ) dari ikatan primer dan *DNA template*.

3. **Extension** (72°C), waktu tergantung panjang pendeknya ukuran DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi. Pada tahap *extension* ini terjadi proses pemanjangan untai baru DNA, dimulai dari posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan. Pada setiap satu kilobase (1000bp) yang akan diamplifikasi memerlukan waktu 1 menit. Sedang bila kurang dari 500bp hanya 30 detik dan pada kisaran 500 tapi kurang dari 1kb perlu waktu 45 detik, namun apabila lebih dari 1kb akan memerlukan waktu 2 menit di setiap siklusnya.

Prinsip pelipatgandaan jumlah molekul DNA pada target yang diinginkan melalui teknik PCR dijelaskan pada **Gambar 2.1** sebagai berikut (Muladno, 2010):



**Gambar 2.1** Siklus Pembentukan Molekul DNA Baru dalam Proses PCR (Muladno, 2010)

Pada suhu 95°C, DNA mengalami denaturasi sehingga strukturnya berubah dari untai ganda menjadi untai tunggal. Pada suhu 50°-60°C, *primer forward* akan menempel pada posisi komplementernya demikian pula *primer reversenya*. Setelah kedua primer tersebut menempel pada posisinya masing-masing, enzim *polymerase* mulai mensintesis molekul DNA baru yang dimulai dari ujung 3' masing-masing primer. Sintesa molekul DNA baru ini dimulai pada suhu 72°C. Satu molekul DNA ganda akan berlipat jumlahnya menjadi dua molekul DNA. Setelah itu, diulang kembali proses denaturasi, penempelan dan sintesis pada suhu tersebut. Proses dari *denaturation* hingga *extention* disebut sebagai satu siklus. Suhu *denaturation* dan *extention* bersifat permanen, masing-masing pada 95°C dan 72°C, sedangkan suhu *annealing* bergantung pada panjang-pendeknya primer (Muladno, 2010).

Teknik *polymerase chain reaction (PCR)* sudah secara luas digunakan dalam biologi molekuler, mikrobiologi, genetika, diagnostik, laboratorium klinik, forensik, environmental science, hereditas, paternity testing, dan lain-lain. *Polymerase chain reaction (PCR)* bergantung pada kemampuan untuk

mendenaturasi (*melt*) molekul DNA secara teratur dan *renature* (*anneal*) komplemennya. Keberadaan *noncomplementary strands* memiliki efek kecil pada pasangan basa dari *complementary single DNA strand* atau wilayah komplemen dari untai DNA. Kebutuhan lain untuk PCR adalah kemampuan untuk mensintesis oligonukleotida minimal panjangnya 18-20 nukleotida dengan sekuen berbeda (Lodish, 2003).

## 2.5 Sekuensing

Pada dasarnya prinsip dari sekuensing berdasarkan pada dua metode, yaitu metode Maxam-Gilbert dan metode Sanger yang diperkenalkan pada tahun 1977. Namun, beberapa teknik sekuensing atau *molecular typing* telah berkembang beberapa tahun ini untuk mengidentifikasi dan klasifikasi bakteri. Metode yang paling sering digunakan diketahui sebagai teknik *DNA fingerprinting*, *Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE) of rare-cutting restriction fragments*, ribotyping, *Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*, dan *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)*, dimana telah sering digunakan untuk mengidentifikasi dan sekuensing bakteri asam laktat yang diisolasi dari produk makanan fermentasi dan juga dari saluran pencernaan manusia (McCartney, 2002).

Metode Maxam-Gilbert melibatkan proses degradasi kimiawi terhadap fragmen DNA yang akan disekuens. Fragmen DNA yang telah dilabel radioaktif pada salah satu ujungnya dipotong tak sempurna (*partial digest*) dalam empat reaksi kimia yang terpisah. Tiap reaksi membuat fragmen DNA

tersebut terpotong pada basa tertentu dan menghasilkan empat macam populasi fragmen DNA yang semua ujungnya berlabel. Tiap populasi terdiri atas campuran fragmen DNA yang panjangnya ditentukan oleh lokasi basa tertentu di sepanjang fragmen DNA yang disekuens tersebut. Populasi fragmen DNA tersebut kemudian dipisahkan dengan cara elektroforesis melalui *gel polyacrilamida* dan fragmen DNA yang berlabel pada ujungnya tersebut akan terdeteksi melalui cara autoradiografi (Muladno, 2010).

Metode Sanger menggunakan pendekatan sintesis molekul DNA baru dan pemberhentian sintesis tersebut pada basa tertentu. Sintesis molekul DNA diperlukan dNTPs (*Deoxynucleoside Triphosphates*) sebagai bahan utamanya, untuk menghentikan proses sintesis diperlukan ddNTPs (*Dideoxynucleoside Triphosphates*). 2', 3' ddNTPs tidak mempunyai gugus hidroksil pada posisi 3' deoxyribose. ddNTPs dapat digabungkan oleh enzim *Taq polymerase* pada untai DNA yang sedang disintesis melalui gugus triphosphat 5'. Tidak adanya gugus 3'-hidroksil mencegah terbentuknya ikatan *phosphodiester* dengan dNTP berikutnya. Sintesis DNA tidak mungkin dilanjutkan dan berhenti pada posisi ddNTP. Jika satu jenis ddNTP dicampur dengan dNTP dalam satu larutan reaksi, terjadi kompetisi antara dNTP yang memperpanjang molekul DNA dan ddNTP yang memberhentikan proses pemanjangan tersebut (Muladno, 2010).

Sejumlah potongan DNA yang panjangnya bervariasi tetapi semuanya berakhir dengan nukleotida A merupakan hasil akhir dari reaksi tersebut. Demikian juga bila dNTP dicampurkan dengan ddNTP yang lain.

Memanfaatkan empat ddNTP yang berbeda (A, C, G, dan T) dalam empat reaksi enzimatik yang terpisah, setiap reaksi akan menghasilkan sejumlah molekul DNA yang panjangnya bervariasi (berbeda satu basa saja) dan basa terakhirnya sama bergantung dari ddNTP yang digunakan (Muladno, 2010).

## 2.6 Analisis Kekerabatan (Filogenetik)

Filogenetik merupakan studi yang membahas tentang hubungan kekerabatan antar berbagai macam organisme melalui analisis molekuler dan morfologi. Para ahli biologi secara tradisional menggambarkan silsilah atau genealogi organisme pada pohon filogenetik, yaitu diagram yang melacak hubungan evolusioner yang dapat mereka tentukan sebaik mungkin (Campbell *et al.*, 2003). Analisis kekerabatan filogenetik sangat penting untuk digunakan dalam penelusuran kekerabatan evolusioner diantara berbagai takson yang ada (Mabrouk *et al.*, 2006).

Selama beberapa dekade, penelitian tentang analisis filogenetik suatu organisme lebih banyak didasarkan pada pengamatan secara morfologi, anatomi, paleontologi, dan fisiologi (Pevsner, 2003). Namun saat ini, penelusuran filogenetik suatu organisme banyak didasarkan pada pengamatan secara molekuler. Sekuen DNA mitokondria atau kloroplas dan ribosom adalah salah satu perangkat molekuler yang dapat dijadikan acuan dalam penelusuran filogenetik (evolusioner) dari suatu takson organisme (Nyffeler and Baum, 2000).

Analisis filogenetik merupakan penentuan bagaimana suatu keluarga mungkin diturunkan selama proses evolusi. Hubungan evolusi berdasarkan sekuen digambarkan dengan menempatkan sekuen sebagai cabang pada suatu pohon filogenetik. Hubungan percabangan pada bagian dalam pohon menggambarkan derajat perbedaan sekuen yang berhubungan. Dua sekuen yang memiliki banyak kemiripan akan ditempatkan dalam cabang yang sama di bawahnya. Analisis filogenetik bertujuan untuk menemukan semua hubungan percabangan dari suatu pohon berdasarkan panjang cabang (Mount, 2001).

Analisis kekerabatan filogenetik diantara sampel (organisme) dapat dimulai dengan pembuatan matrik yang menetapkan status karakter setiap penanda untuk masing-masing sampel (Karp *et al.*, 1997). Hasil analisis tersebut kemudian dapat digambarkan dalam bentuk matrik similaritas maupun disimilaritas dan diilustrasikan dengan pohon filogenetik atau dendogram (Santoso *et al.*, 2005).