

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM
LAKTAT ASAL JEJUNUM KELINCI (*Oryctolagus
cuniculus*) SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK**

SKRIPSI

**Oleh:
YOSSY ALVIANITA WARDANI
115130100111038**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM
LAKTAT ASAL JEJUNUM KELINCI (*Oryctolagus
cuniculus*) SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Asal
Jejunum Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Sebagai
Kandidat Probiotik****Oleh:****YOSSY ALVIANITA WARDANI
115130100111038**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 8 Juni 2018
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Masdiana C. Padaga, drh., M.App.Sc
NIP.19560210 198403 2 002

Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., Msc
NIP. 19820914 200912 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP.19600903 198802 2 001



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Yossy Alvianita Wardani
NIM : 115130100111038
Program Studi : Program Kedokteran Hewan
Penulis Skripsi berjudul : Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Asal
Jejunum Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Sebagai
Kandidat Probiotik

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, July 2018
Yang menyatakan,

Yossy Alvianita Wardani
NIM. 115130100111038

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena telah memberi rahmat dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat asal Jejunum Kelinci sebagai Kandidat Probiotik”**. Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih terutama kepada:

1. Dr. Masdiana C. Padaga, drh., M.App.Sc., selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan bimbingan dan petunjuk selama penelitian dan penyelesaian penulisan skripsi ini.
2. Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., M.,M.Sc., selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan petunjuk selama penelitian dan penyelesaian penulisan skripsi ini.
3. drh. Citra Sari dan drh. Ajeng Erika PH, M.Si selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan masukan dan saran.
4. Prof.Dr. Aulanni'am, drh., DES, selaku dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang telah membantu memberikan fasilitas dan kemudahan selama penelitian.
5. Ayahanda Samsul Hadi, Ibunda Andewi Ambarupni, Adik tercinta Fitria Dwi Andhini serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa, kasih sayang, dan dukungan yang tak terhingga sehingga penulis mampu menyelesaikan studi.
6. Tim Peneliti Probiotik Agdila Okke Kalistasari, Rizky Putri Karina, Fachrian Dwi A, Yoga Dwi Pamungkas dan Ahmad Lega, kakak angkatan 2008, 2009, 2010 dan adik angkatan 2012, teman seperjuangan CLEVER 2011, serta sahabat terdekat atas semangat, doa, inspirasi, keceriaan, dan mimpi-mimpi yang luar biasa.



7. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan Laporan Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, July 2018

Penulis



Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Asal Jejunum Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Sebagai Kandidat Probiotik

ABSTRAK

Bakteri asam laktat adalah bakteri menguntungkan yang memiliki potensi sebagai probiotik. Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah memadai akan memberikan manfaat kesehatan kepada hostnya. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri asam laktat hasil isolasi dari jejunum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) sebagai kandidat probiotik. Isolasi bakteri asam laktat dilakukan dengan menggunakan medium MRSA (*deMan Rogosa Sharpe Agar*) yang ditambahkan CaCO_3 1%. Hasil isolasi bakteri asam laktat dari jejunum kelinci ditemukan jumlah bakteri asam laktat dengan rerata $2,81 \pm 1,37 \times 10^4$ cfu/ml dari bilasan mukosa jejunum dan $4,88 \pm 2,95 \times 10^4$ cfu/ml dari kerokan mukosa jejunum. Berdasarkan uji morfologi, hasil dari 12 isolat bakteri kemudian diuji *screening* dengan uji katalase dan pewarnaan Gram dan didapatkan lima isolat bakteri terpilih. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelima isolat terpilih memiliki karakter: berbentuk batang, katalase negatif, dan termasuk Gram positif. Dari tes fisiologi dan biokimia yang kemudian dianalisis berdasarkan nilai-nilai similaritas, dapat dilakukan pendugaan isolat tersebut mendekati genus *Lactobacillus sp.* Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa kelima isolat terpilih mampu bertahan pada pH 2 dan garam empedu 0,3%. Dengan demikian, isolat dari jejunum kelinci memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai probiotik.

Kata Kunci : bakteri asam laktat, probiotik, jejunum kelinci, saluran pencernaan, asam, garam empedu

Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria From Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) Jejunum as Probiotics Candidate

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are beneficial bacteria that have potential as a probiotic. Probiotics are living microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host. This study aimed to obtain lactic acid bacteria isolate, isolated from rabbit jejunum (*Oryctolagus cuniculus*) as a probiotic candidate. Lactic acid bacteria isolation was performed using MRSA (*deMan Rogosa Sharpe Agar*) medium which added with CaCO₃ 1%. The results of isolation lactic acid bacteria from rabbit jejunum was found lactic acid bacteria with average of $2.81 \pm 1.37 \times 10^4$ cfu/ml from rinsed jejunal mucosa and $4.88 \pm 2.95 \times 10^4$ cfu/ml from scraping jejunal mucosa. Based on the morphological test, the result of 12 isolates was then screened by catalase test and Gram staining test to obtain five selected isolates. The results showed that five selected isolates had character: rods shape, negative catalase-type, and Gram-positive bacteria. From physiological and biochemical tests were then analyzed on the basis of similarity values, it would be predicted that the isolates had similarity with *Lactobacillus sp.* The results also showed that five selected isolates were able to survive at pH 2 and 0.3% of bile salt. Thus, the isolates from rabbit jejunum have a potency to be used as a probiotic candidates.

Keywords : lactic acid bacteria, probiotics, rabbit jejunum, digestive tract, acids, bile salts

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiii
BA B 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kelinci (<i>Oruictolagus cuniculus</i>).....	5
2.1.1 Saluran Pencernaan Kelinci.....	6
2.1.2 Mikroflora Saluran Pencernaan.....	8
2.2 Bakteri Asam Laktat.....	10
2.2.1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	12
2.2.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	13
2.3 Probiotik.....	13
2.3.1 Karakteristik Probiotik.....	15
2.3.2 Ketahanan terhadap Asam Lambung.....	16

2.3.3 Ketahanan terhadap Garam Empedu (<i>Bile Salt</i>).....	16
2.4 Klasifikasi Bakteri.....	17

BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep.....	19
3.2 Hipotesis Penelitian.....	20

BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	21
4.2 Sampel Penelitian	21
4.3 Alat dan Bahan	21
4.3.1 Alat Penelitian.....	21
4.3.2 Bahan Penelitian.....	22
4.4 Rancangan Penelitian	22
4.5 Tahapan Penelitian	23
4.5.1 Persiapan Sampel.....	23
4.5.2 Isolasi Bakteri dari Jejunum Kelinci.....	24
4.5.3 <i>Total Plate Count</i> (TPC).....	24
4.5.4 Seleksi dan Pemurnian Bakteri Asam Laktat.....	25
4.5.5 Uji Katalase.....	25
4.5.6 Karakterisasi Bakteri Asam Laktat.....	26
4.5.6.1 Morfologi.....	26
4.5.6.2 Fisiologi.....	27
4.5.6.3 Biokimia.....	28
4.5.7 Analisis Similaritas dengan Menggunakan Program CLAD97.....	30
4.5.8 Uji Potensi Probiotik.....	31
4.5.8.1 Uji Ketahanan terhadap Asam Lambung.....	31
4.5.8.2 Uji Ketahanan terhadap Garam Empedu.....	32
4.6 Analisis Data.....	32



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Jumlah Bakteri Asam Laktat pada Jejunum Kelinci..... 33

5.2 Karakteristik Bakteri Asam Laktat pada Jejunum Kelinci..... 34

5.3 Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Jejunum Kelinci..... 35

 5.3.1 Berdasarkan Sifat Morfologi, Fisiologi dan
 Biokimia..... 35

 5.3.2 Berdasarkan Uji Similaritas Menggunakan
 Program CLAD97..... 37

5.4 Uji Potensi Bakteri Asam Laktat Sebagai Kandidat Probiotik..... 39

 5.4.1 Ketahanan terhadap Asam Lambung..... 39

 5.4.2 Ketahanan terhadap Garam Empedu..... 41

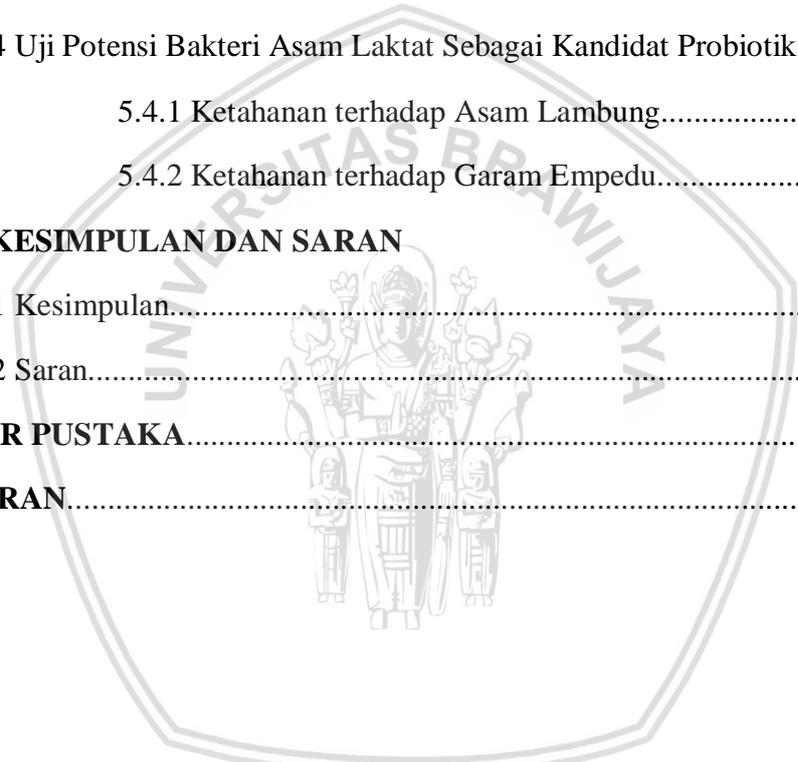
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan..... 46

6.2 Saran..... 46

DAFTAR PUSTAKA..... 47

LAMPIRAN..... 55



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Rata-rata jumlah bakteri asam laktat pada jejunum kelinci.....	33
5.2 Morfologi koloni dan sel bakteri asam laktat asal jejunum kelinci.	34
5.3 Karakteristik 5 isolat bakteri asam laktat terpilih.....	36



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Sistem saluran pencernaan kelinci.....	7
5.1 Dendogram uji similaritas hubungan kekerabatan 5 isolat bakteri asam laktat asal jejunum kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)..	38
5.2 Kemampuan pertumbuhan bakteri asam laktat pada pH 2.....	39
5.3 Kemampuan pertumbuhan bakteri asam laktat pada garam empedu.....	43



DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

°C	: derajat Celcius
BPA	: <i>Baird Parker Agar</i>
BPW	: <i>Buffer Pepton Water</i>
CF	: <i>Colony Forming Unit</i>
Cfu/ml	: <i>colony forming unit/ml</i>
<i>Feed additive</i>	: Bahan yang ditambahkan kedalam pakan dengan jumlah sedikit dengan tujuan tertentu
HTU	: <i>Hypothetical Taxon Unit</i>
ICMF	: <i>International Comission Microbiology Food</i>
MRSA	: <i>deMan Rogosa and Sharp Agar</i>
MRSB	: <i>deMan Rogosa and Sharp Broth</i>
O/F	: Oksidatif Fermentatif
OD	: <i>Optical Density</i>
SIM	: <i>Sulfit Indol Motility</i>
Toksin	: Senyawa-senyawa berbahaya
TPC	: <i>Total Plate Count</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Kelinci saat ini menjadi salah satu hewan yang sedang digemari oleh masyarakat. Selain menjadi hewan peliharaan, kelinci dikembangbiakkan sebagai bahan konsumsi dan hewan ternak. Tingkat kematian kelinci akibat penyakit pencernaan cukup tinggi, berkisar 15-40% terutama dari masa kelahiran hingga penyapihan (Masanto dan Agus, 2011). Salah satu penyakit pencernaan yang sering menyerang kelinci yaitu enteritis (McNitt *et al.*, 2013). Enteritis adalah penyakit atau gangguan pada saluran pencernaan, dan menjadi penyebab kematian paling umum terutama pada anak kelinci (Harkness *and* Wagners, 2011).

Mikroflora pencernaan pada kelinci masa sapih masih belum seimbang (Esther, 2017). Ketidakseimbangan mikroflora yang ada pada saluran pencernaan dapat menyebabkan daya tahan tubuh menurun, sehingga mendorong mikroba patogen di dalam saluran pencernaan untuk berkembang (Amy, 2008). Pada usus halus manusia, umumnya jumlah mikroba berkisar 10^4 /ml (Lynne, 2009), sedangkan menurut Philip *and* Hill (2000) jumlah mikroba pada jejunum manusia berkisar antara 10^2 - 10^4 /ml. Jejunum adalah bagian tengah dari usus halus yang berfungsi untuk penyerapan karbohidrat dan protein dalam proses pencernaan (Ron *and* Jennifer, 2008). Pada kelinci, mikroba yang terdapat pada usus besar (*caecum-colon*) berkisar 10^{10} sampai 10^{12} bakteri /g, sedangkan pada usus halus bagian ileum jumlahnya lebih rendah yaitu berkisar 10^6 sampai 10^8 bakteri /g (Combes *et al.*, 2012).

Toksin yang dihasilkan bakteri patogen pada saluran pencernaan kelinci dapat menyebabkan gangguan, salah satunya adalah enteritis (McNitt *et al.*, 2013). Pencegahan penyakit enteritis ini dapat dilakukan salah satunya dengan cara pemberian probiotik. Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang digunakan sebagai *feed additive* untuk hewan dan manusia, yang dapat mengatur aktivitas mikrobiota sistem pencernaan untuk meningkatkan kesehatan hostnya (Combes *et al.*, 2012). Probiotik umumnya berasal dari golongan bakteri asam laktat. Efek positif dari probiotik untuk kontrol patogen tertentu pada hewan telah ditunjukkan dalam beberapa penelitian, di mana mereka muncul untuk mengendalikan penyakit enterik yang terkait dengan *Escherichia coli* atau patogen enterik lainnya (Kritas dan Morrison, 2005; Timmerman *et al.*, 2005). Mikroflora pada probiotik akan bersaing dengan mikroflora pada usus yang berbahaya kemudian merangsang sistem kekebalan tubuh, oleh karena itu probiotik akan meningkatkan resistensi terhadap agen infeksi (O'hara and Shanahan, 2006).

Penggunaan probiotik akan lebih efektif apabila menggunakan jenis mikroorganisme *indigenous* yang berasal dari saluran pencernaan dan lingkungan yang sama dengan hewan inang, karena mampu beradaptasi lebih baik dibandingkan dengan mikroorganisme yang berasal dari lingkungan yang berbeda. Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi bakteri asam laktat dari saluran pencernaan kelinci terutama bagian usus halus yaitu jejunum yang belum pernah dilakukan sebelumnya.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan yaitu sebagai berikut:

1. Apakah terdapat bakteri asam laktat pada jejunum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)?
2. Bagaimana karakteristik bakteri asam laktat hasil isolasi dari jejunum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) berdasarkan ketahanan terhadap asam dan garam empedu?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan yang digunakan pada penelitian ini adalah kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang berumur 5 minggu dalam kondisi sehat dan tanpa perlakuan diambil dari peternakan kelinci Karangploso (Esther, 2017). Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat Laik Etik No. 655-KEP-UB dari Komite Laik-Etik Universitas Brawijaya Malang.
2. Sampel berupa bilasan mukosa usus dan kerokan usus yang diisolasi dari jejunum kelinci secara aseptis dengan cara jejunum yang telah dipotong dibilas dengan larutan BPW (*Buffer Pepton Water*), setelah itu jejunum yang telah dibilas, mukosanya dikerok sebanyak 1 g lalu dilakukan pengenceran (Anastiawan, 2014).

3. Bakteri asam laktat ditumbuhkan pada media MRSA + CaCO₃ 1% kemudian dilanjutkan dengan uji pewarnaan Gram dan uji katalase, setelah itu dilanjutkan dengan karakterisasi yang meliputi uji morfologi, uji fisiologi dan uji biokimia (Barrow *and* Feltham, 1993).
4. Karakterisasi bakteri asam laktat dilakukan dengan cara uji potensi bakteri asam laktat, yaitu uji ketahanan terhadap asam dan ketahanan terhadap garam empedu (Anastiawan, 2014).

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan isolat bakteri asam laktat hasil isolasi dari jejunum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) sebagai kandidat probiotik.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk mengetahui isolat bakteri asam laktat yang di isolasi dari jejunum kelinci yang dapat digunakan sebagai *prototype* probiotik, sumber informasi untuk meningkatkan ilmu pengetahuan dalam pemanfaatan probiotik sebagai suplemen kesehatan bagi kelinci dan menjadi acuan untuk penelitian selanjutnya terkait pengembangan isolat bakteri asam laktat sebagai kandidat probiotik.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)

Kelinci termasuk hewan yang memiliki sistem pencernaan monogastrik dan tidak dapat mencerna serat-serat secara baik, sehingga kelinci disebut pseudo-ruminansia. Kelinci *New Zealand White* memiliki keunggulan seperti pertumbuhannya yang cepat sehingga pada umur 7-8 bulan sudah bisa dikawinkan (Wijayanti, 2017). Menurut Susilorini dkk (2008) kelinci dalam klasifikasinya adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub phylum	: Vertebrata
Ordo	: Logomorpha
Familia	: Leporidae
Sub family	: Leporine
Genus	: <i>Oryctolagus</i>
Spesies	: <i>Oryctolagus cuniculus</i>

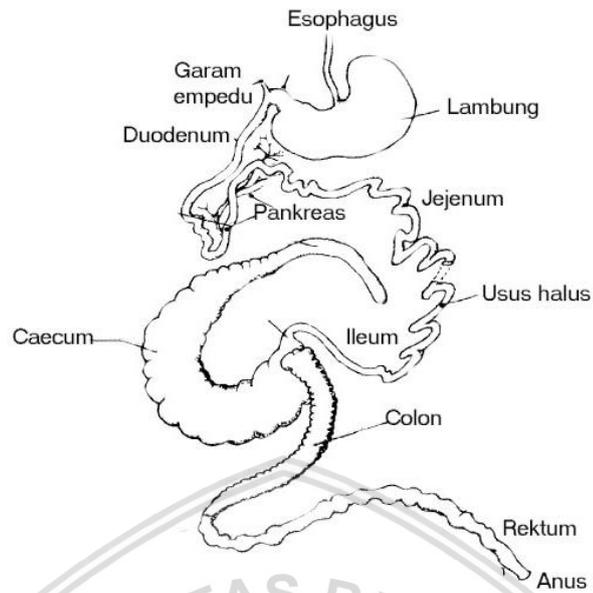
Kelinci merupakan salah satu ternak penghasil daging. Daging kelinci mempunyai kualitas tinggi yang ditandai dengan kandungan protein tinggi sebesar 20,8% dan kandungan lemak yang rendah sebesar 10,2% sehingga lebih baik dibandingkan dengan daging unggas atau ternak lain serta serat daging yang lebih halus dibanding dengan daging sapi, domba ataupun kambing (Hustamin, 2006).

Kelinci merupakan hewan herbivora yang bukan termasuk ruminansia, kurang mampu untuk mencerna serat kasar, tetapi dapat mencerna protein dari

tanaman berserat dan memanfaatkannya dengan efektif, hal ini memungkinkan kelinci dapat makan serta memanfaatkan bahan-bahan hijauan, rumput dan sejenisnya. Kelinci mempunyai kebiasaan yang tidak dilakukan pada hewan ternak ruminansia, yaitu kebiasaannya memakan feses yang sudah dikeluarkan atau biasa disebut dengan *coprophagy*. Sifat *coprophagy* biasanya terjadi pada malam atau pagi hari berikutnya.

2.1.1 Saluran Pencernaan Kelinci

Saluran pencernaan kelinci merupakan suatu saluran yang memanjang dari mulut hingga anus. Saluran tersebut dapat dibedakan menjadi rongga mulut, esofagus, lambung, usus halus, usus besar dan anus. Berdasarkan sistem pencernaannya, kelinci diklasifikasikan ke dalam *hindgut fermentor* yaitu saluran pencernaan bagian belakang memegang peranan penting seperti *caecum* dan *colon* (Rohimah, 2012). Pada ternak ruminansia fermentasi serat terjadi di dalam rumen, fermentasi pakan pada kuda terjadi di dalam *colon*, sedangkan pada kelinci terjadi di dalam *caecum* (Irlbeck, 2007). Bagian-bagian sistem pencernaan kelinci ditampilkan pada **Gambar 2.1**



Gambar 2.1 Sistem saluran pencernaan kelinci (Abdul, 2009)

Pencernaan di dalam mulut kelinci dilakukan secara mekanik (mastikasi) dengan tujuan memecah pakan menjadi bagian-bagian yang lebih kecil agar mudah ditelan dan menuju esofagus. Esofagus mengalirkan makanan dari faring turun ke lambung. Lambung berfungsi sebagai tempat pencernaan dan penyimpanan pakan sementara. Konsentrasi asam dalam getah lambung menurunkan pH pakan sampai 2,0. Setelah mengalami pencernaan kimiawi dan enzimatik makanan menuju usus halus melalui pilorus yaitu batas antara lambung dan usus halus (Hustamin, 2006).

Usus halus terdiri dari tiga bagian yaitu duodenum, jejunum, dan ileum. Pada duodenum terjadi penetralan bolus yang asam oleh getah empedu dan pemecahan sari makanan oleh sekresi pankreas (lipase dan amilase) (Soeharsono, 2010). Jejunum adalah bagian tengah dari usus halus, membentuk sekitar 2/5 dari total panjang usus halus. Tugas utama jejunum adalah untuk penyerapan karbohidrat dan protein (Carlos and Julian, 2010).

Pakan yang telah tercerna dengan baik akan diabsorpsi oleh usus halus, sedangkan pakan yang tidak mengalami absorpsi akan menuju ke *caecum* melewati *ileo-cecal valve* yaitu katup antara usus halus dan *caecum* (Soeharsono, 2010). *Caecum* berfungsi sebagai tempat fermentasi. Mikroorganisme yang terdapat pada *caecum* akan aktif dalam mendegradasi pakan secara fermentatif. Gerakan peristaltik akan mendorong digesta ke arah *colon* dan di *colon* terjadi penyerapan air serta zat anorganik sehingga terbentuk feses setengah keras. Rektum merupakan bagian akhir dari usus besar dan fungsinya sebagai tempat menahan feses sebelum dikeluarkan melalui anus (Herman, 2000).

2.1.2 Mikroflora Saluran Pencernaan

Saluran pencernaan merupakan habitat mikroflora yang segera terbentuk setelah hewan tersebut dilahirkan (Ghafur, 2009). Di dalam saluran pencernaan, hidup berbagai jenis mikroba seperti bakteri, khamir dan kapang yang memegang peranan sangat penting bagi kesehatan (Pato, 2012). Mikroflora saluran pencernaan adalah mikroorganisme yang secara normal tinggal di saluran pencernaan dan dapat melaksanakan sejumlah fungsi bermanfaat untuk inangnya. Mikroflora normal yang menetap tersebut tidak menyebabkan penyakit dan dapat bermanfaat apabila mikroorganisme tersebut berada pada tempat semestinya serta dalam keadaan normal.

Mikroflora pada saluran pencernaan sangat bervariasi antara satu individu dengan individu lain. Mikroflora yang stabil dan seimbang merupakan pertanda keadaan saluran cerna yang sehat (Yin and Zheng, 2005). Mikroflora yang menyokong kesehatan hewan terdiri dari berbagai

macam spesies mikroorganisme seperti *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* dan *Bacteroides* yang sebagian besar merupakan mikroorganisme dominan, serta kelompok lainnya adalah *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, dan *Clostridium*.

Terdapat lebih kurang 300-400 spesies mikroba dengan jumlah sekitar 10^{13} - 10^{14} sel hidup per gram kandungan saluran pencernaan pada manusia. Jumlah dan jenis mikroba ini masih sebatas jumlah mikroba yang bersifat “culturable” (Pato, 2012). Pada usus halus manusia, umumnya jumlah mikroba berkisar 10^4 /ml (Lynne, 2009), sedangkan menurut Philip and Hill (2000) jumlah mikroba pada jejunum manusia berkisar antara 10^2 - 10^4 /ml. Pada kelinci, mikroba melimpah (10^{10} sampai 10^{12} bakteri /g) terdapat pada usus besar yaitu *caecum-colon* (Combes *et al.*, 2012).

Secara umum mikroba dapat dikelompokkan ke dalam dua golongan besar, golongan pertama disebut mikroba menguntungkan (*beneficial microbes*) dan golongan kedua disebut mikroba berbahaya (*harmful microbes*). Bila mikroba berbahaya mendominasi mikroba lainnya di dalam saluran pencernaan akan menyebabkan timbulnya berbagai penyakit. Sebaliknya, bila jumlah mikroba menguntungkan mendominasi saluran pencernaan maka pembentukan senyawa-senyawa berbahaya (toksin) dapat dihambat sehingga secara tidak langsung akan menjaga kondisi saluran pencernaan tetap sehat dan pada akhirnya kesehatan tubuh secara keseluruhan akan terpelihara (Pato, 2012).

2.2 Bakteri Asam Laktat

Saluran pencernaan manusia ataupun hewan diperkirakan mengandung flora normal sampai 10^{12} bakteri per gram isi saluran cerna dan setidaknya terdiri atas 500 spesies yang sebagian besar merupakan bakteri asam laktat (Suardana dkk., 2007). Bakteri asam laktat merupakan salah satu mikrobiota alami yang terdapat dalam saluran pencernaan. Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri Gram positif berbentuk kokus atau batang, tidak membentuk spora, pada umumnya tidak motil, katalase negatif, tumbuh pada kisaran pH 2,5-8,0, tumbuh pada berbagai suhu antara 5°C sampai 50°C dengan asam laktat sebagai produk utama fermentasi karbohidrat. Sifat-sifat khusus bakteri asam laktat adalah mampu tumbuh pada kadar gula, alkohol, dan garam yang tinggi, serta mampu memfermentasikan monosakarida dan disakarida.

Bakteri asam laktat merupakan golongan mikroorganisme bermanfaat dengan sifat tidak toksik bagi inangnya dan mampu membunuh bakteri patogen (Klaenhammer *et al.*, 2005). Sebagian besar bakteri asam laktat dapat tumbuh sama baiknya di lingkungan yang memiliki dan tidak memiliki O_2 (tidak sensitif terhadap O_2). Hampir semua bakteri asam laktat hanya memperoleh energi dari metabolisme gula sehingga habitat pertumbuhannya hanya terbatas pada lingkungan yang menyediakan cukup gula atau bisa disebut dengan lingkungan yang kaya nutrisi.

Bakteri asam laktat dapat memproduksi asam laktat, asam asetat, etanol, dan CO_2 . Aktivitas bakteri ini dapat menyebabkan penurunan pH dimana bakteri patogen tidak dapat tumbuh pada pH yang rendah. Selain menghasilkan asam laktat, bakteri asam laktat juga menghasilkan berbagai senyawa metabolit,

diantaranya adalah hidrogen peroksida, bakteriosin, enzim *β galactosidase*, enzim *bile salt hidrolase*, vitamin, dan asam lemak rantai pendek, yang jumlahnya spesifik pada tiap strain bakteri. Berbagai jenis senyawa metabolit ini umumnya memberikan manfaat positif terhadap kesehatan manusia, yaitu menjaga kesinambungan mikroflora saluran pencernaan dan mencegah berbagai penyakit (Ernawati, 2008).

Bakteri asam laktat dapat dibedakan atas dua kelompok berdasarkan hasil fermentasinya, yaitu (Reddy *et al.*, 2008):

1. Bakteri homofermentatif: memproduksi asam laktat sebagai produk utama dari fermentasi glukosa. Contoh: *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* dan *Lactococcus*.
2. Bakteri heterofermentatif: memproduksi asam laktat, karbon dioksida dan etanol dalam jumlah yang relatif sama. Contoh: *Leuconostoc* dan beberapa *Lactobacillus*.

Bakteri asam laktat memiliki dua habitat ekologi, yaitu pada saluran pencernaan manusia atau hewan dan produk makanan atau minuman, baik sebagai kontaminan alami maupun sengaja ditambahkan untuk tujuan fermentasi. Bakteri asam laktat diklasifikasikan berdasarkan pada morfologi, tipe fermentasi glukosa, suhu pertumbuhan, produksi asam laktat, kemampuan hidup pada konsentrasi garam tinggi, asam, atau alkalin (Maridha, 2012). Bakteri asam laktat terdiri atas tiga belas genus, yaitu *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* dan *Weissella* (Jay *et al.*, 2005). *Lactobacillus* ditemukan pada habitat yang kaya karbohidrat,

seperti pada membran mukosa manusia dan hewan (rongga mulut, usus, dan vagina), tumbuhan dan material tumbuhan, serta makanan fermentasi.

2.2.1 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum merupakan salah satu jenis bakteri asam laktat heterofermentatif dengan temperatur optimal lebih rendah dari 37°C. *Lactobacillus plantarum* berbentuk batang (0,5-1,5 s/d 1,0-10 µm) dan tidak bergerak (non motil). Bakteri ini memiliki sifat katalase negatif, aerob atau fakultatif anaerob, cepat mencerna protein, tidak mereduksi nitrat, toleran terhadap asam, dan mampu memproduksi asam laktat (Novirisandi, 2012). Dalam media agar, *L. plantarum* membentuk koloni berukuran 2-3 mm, berwarna putih opaque, konveks, dan dikenal sebagai bakteri pembentuk asam laktat. *Lactobacillus plantarum* mampu merombak senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan hasil akhirnya yaitu asam laktat (Nguyen *et al.*, 2007).

Bakteri asam laktat dapat menghasilkan pH yang rendah pada substrat sehingga menimbulkan suasana asam. Dalam keadaan asam, *L. plantarum* memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri patogen dan bakteri pembusuk. Pertumbuhan *L. plantarum* dapat menghambat kontaminasi dari mikroorganisme patogen dan penghasil racun karena kemampuannya untuk menghasilkan asam laktat dan menurunkan pH substrat, selain itu dapat menghasilkan hidrogen peroksida yang dapat berfungsi sebagai antibakteri. *Lactobacillus plantarum* juga mempunyai kemampuan untuk menghasilkan bakteriosin yang berfungsi sebagai zat antibiotik (Novirisandi, 2012).

2.2.2 *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus adalah salah satu dari delapan genera umum bakteri asam laktat. *Lactobacillus acidophilus* dapat tumbuh baik dengan oksigen ataupun tanpa oksigen, bakteri ini dapat hidup pada lingkungan yang sangat asam sekalipun, seperti pada pH 4-5 atau dibawahnya dan bakteri ini merupakan bakteri homofermentatif yaitu bakteri yang memproduksi asam laktat sebagai satu-satunya produk akhir (Triana dan Nurhidayat, 2007). *Lactobacillus acidophilus* merupakan bakteri probiotik yang selama bertahun-tahun banyak digunakan, karena aman dan tidak menimbulkan risiko infeksi. *Lactobacillus acidophilus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang dapat menyebabkan terjadinya infeksi saluran cerna (Xiaodong *et al.*, 2009). *Lactobacillus acidophilus* mampu memproduksi laktase, vitamin K, dan zat antimikroba sehingga keberadaan *L. acidophilus* dalam tubuh membantu menjaga kondisi asam, sehingga mencegah infeksi mikroba.

2.3 Probiotik

Probiotik merupakan organisme hidup yang mampu memberikan efek menguntungkan bagi kesehatan hostnya apabila dikonsumsi dalam jumlah yang cukup dengan cara memperbaiki keseimbangan mikroflora intestinal pada saat masuk dalam saluran pencernaan (Weichselbaum, 2009). Probiotik didefinisikan sebagai kultur hidup satu macam mikroba atau lebih yang diberikan pada manusia atau hewan dan memiliki efek menguntungkan bagi inangnya (manusia atau hewan) dengan cara menjaga keseimbangan mikroflora alami dalam tubuh. Jenis mikroba tersebut harus sudah dinyatakan aman digunakan sebagai bahan pakan

atau pangan. Mekanisme kerja probiotik agar tubuh tetap sehat adalah mengupayakan jumlah bakteri baik lebih banyak dibandingkan bakteri jahat, sehingga populasi bakteri yang menguntungkan lebih dominan dibanding bakteri yang merugikan (Novirisandi, 2012).

Probiotik secara aktif dapat meningkatkan kesehatan dengan cara memperbaiki flora usus jika dikonsumsi dalam keadaan hidup dalam jumlah yang memadai. Tujuan utama dari fungsi probiotik adalah memperbaiki sistem pertahanan usus, baik dengan efek barrier langsung, ataupun melalui pengaturan imunitas, sehingga kriteria untuk probiotik adalah kemampuan untuk berkoloni walaupun sementara pada usus, terutama pada saluran pencernaan bagian atas seperti usus halus dan lambung dengan efek barrier yang lebih kuat melawan bakteri patogen atau menjaga kekebalan. Apabila hal ini tercapai, pencegahan infeksi saluran pencernaan menjadi memungkinkan dengan probiotik (Soeharsono dkk., 2010).

Manfaat probiotik bagi inang dapat melalui mekanisme fungsi protektif, yaitu kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen dalam saluran pencernaan. Terbentuknya kolonisasi probiotik dalam saluran pencernaan, mengakibatkan kompetisi nutrisi dan lokasi adhesi (penempelan) antara probiotik dan bakteri lain, khususnya bakteri patogen. Pertumbuhan probiotik juga akan menghasilkan berbagai komponen anti bakteri (asam organik, hidrogen peroksida, dan bakteriosin yang mampu menekan pertumbuhan patogen) (Collado *et al.*, 2009).

Probiotik umumnya berasal dari golongan bakteri asam laktat, khususnya genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* yang merupakan bagian dari flora

normal pada saluran pencernaan (Sujaya dkk., 2008). Kedua jenis bakteri ini dapat menstimulasi respon imun dan menghambat patogen. Salah satu faktor kunci dalam seleksi *starter* probiotik yang baik yaitu kemampuannya untuk bertahan dalam lingkungan asam. Mikroorganisme tersebut harus non-patogen, Gram positif, *strain* yang spesifik, anti *E. Coli*, tahan terhadap cairan empedu, hidup dan dapat melekat pada mukosa usus.

2.3.1 Karakteristik Probiotik

Idealnya strain probiotik tidak hanya mampu bertahan melewati saluran pencernaan tetapi juga memiliki kemampuan untuk berkembang biak dalam saluran pencernaan, tahan terhadap cairan lambung dan cairan empedu dalam jalur makanan yang memungkinkan untuk bertahan hidup melintasi saluran pencernaan dan terkena paparan empedu. Selain itu, probiotik juga harus mampu menempel pada sel epitel usus, mampu membentuk kolonisasi pada saluran pencernaan, mampu menghasilkan zat anti mikroba, dan memberikan pengaruh yang menguntungkan inangnya. Syarat lainnya adalah tidak bersifat patogen dan aman jika dikonsumsi (Prado *et al.*, 2008).

Probiotik umumnya diberikan secara per oral sehingga bakteri ini harus mampu bertahan hidup sampai dengan lambung dan usus, perlawanan terhadap pH rendah cairan lambung dan garam empedu pada usus halus adalah salah satu faktor penting dari bakteri probiotik (Yin *and* Zheng, 2005). Karakterisasi bakteri asam laktat yang dapat digolongkan ke dalam bakteri probiotik adalah diketahui sebagai materi yang tidak berbahaya, dapat hidup selama dilakukan proses dan penyimpanan, memiliki efek

antagonis terhadap bakteri patogen, toleran terhadap asam lambung, getah pankreas dan cairan empedu serta mampu melindungi epitelium inangnya (Velez, 2007).

2.3.2 Ketahanan terhadap Asam Lambung

Syarat penting suatu isolat untuk dapat menjadi probiotik adalah tahan terhadap asam lambung. Hal ini disebabkan bila isolat tersebut masuk ke dalam saluran pencernaan, maka ia harus mampu bertahan dari pH asam lambung (sekitar 2,5). Setiap hari lambung memproduksi lebih kurang 2-3 liter getah lambung. Berdasarkan hasil uji yang telah dilakukan Djide dan Wahyudin (2008), isolat bakteri probiotik mampu tumbuh pada pH 2,5-3. Hal ini membuktikan bahwa isolat bakteri asam laktat tersebut mampu untuk melewati asam lambung sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bakteri probiotik. Bakteri yang tahan asam memiliki ketahanan yang lebih besar terhadap kerusakan membran akibat penurunan pH ekstraseluler dibandingkan dengan bakteri yang tidak tahan terhadap asam. Tiap galur memiliki ketahanan yang berbeda terhadap pH rendah atau asam, contohnya *Lactobacillus* lebih toleran terhadap pH rendah daripada *Lactococcus* dan *Streptococcus* (Farida, 2006).

2.3.3 Ketahanan terhadap Garam Empedu (*Bile Salt*)

Ketahanan bakteri asam laktat terhadap garam empedu juga merupakan syarat penting untuk probiotik. Seperti halnya ketahanan terhadap asam, semua mikroba yang berhasil hidup setelah ditumbuhkan dalam MRSA yang ditambah 0,3% garam empedu (*oxgal*), dinyatakan bersifat tahan terhadap garam empedu. Toleransi bakteri asam laktat

terhadap garam empedu pada konsentrasi 0,3% merupakan konsentrasi kritis untuk menyeleksi isolat yang resisten terhadap garam empedu. Konsentrasi 0,3% terdapat pada bagian atas usus halus (jejunum) karena jejunum dekat dengan kantung empedu (Sri dan Herlisa, 2012).

Penelitian tentang ketahanan bakteri asam laktat terhadap garam empedu yang telah dilakukan Fathin (2015) menunjukkan bahwa seluruh isolat bakteri asam laktat pada penelitian ini memiliki tingkat ketahanan hidup >90% pada kondisi 0,5% garam empedu dengan inkubasi 5 jam, Sedangkan hasil penelitian Lee *et al.* (2014) menunjukkan bahwa tingkat ketahanan hidup bakteri asam laktat sebesar 26,6% pada kondisi 0,3% garam empedu dengan inkubasi 2 jam. Beberapa galur bakteri asam laktat mampu bertahan pada kondisi garam empedu disebabkan karena bakteri asam laktat memiliki kemampuan memetabolisme garam empedu.

2.4 Klasifikasi Bakteri

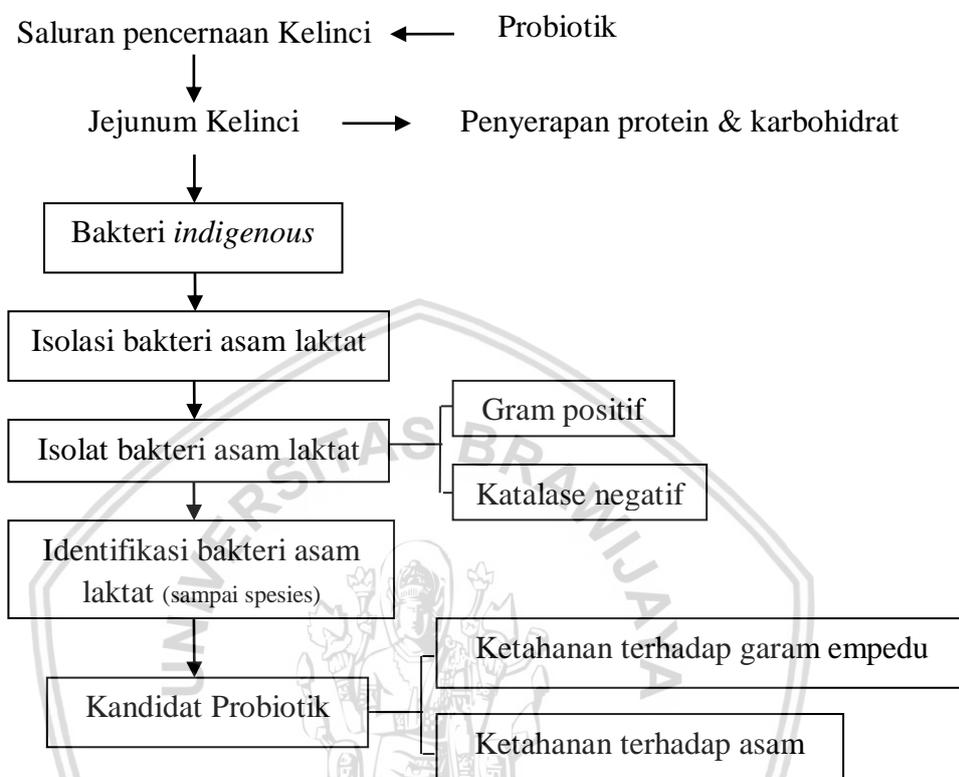
Klasifikasi dapat diidentifikasi sebagai penyusunan suatu organisme kedalam suatu kelompok taksonomi (taksa) berdasarkan persamaan atau hubungan. Klasifikasi organisme seperti bakteri memerlukan pengetahuan yang didapat dari pengalaman dan juga teknik observasi, sifat biokimia, fisiologi, genetik dan morfologi yang penting untuk menggambarkan sebuah takson. Klasifikasi dan identifikasi mikroorganisme haruslah diketahui terlebih dahulu karakteristik atau ciri-ciri mikroorganisme. Karena ukuran yang sangat kecil, tidaklah mungkin untuk mempelajari satu mikroorganisme saja, sehingga yang dipelajari adalah karakteristik suatu biakan yang merupakan populasi dari suatu mikroorganisme (Maghfiroh, 2010).

Taksonomi dapat dilakukan secara numerik ataupun secara fenetik. Taksonomi secara numerik (*numerical taxonomy*) adalah taksonomi yang dikelompokkan berdasarkan pada informasi sifat suatu organisme yang dikonversikan ke dalam bentuk yang sesuai untuk analisis numerik dan dibandingkan menggunakan komputer, dengan adanya karakter yang dapat dibandingkan. Karakter tersebut di antaranya adalah karakter morfologi, biokimiawi, dan fisiologi. Koefisien asosiasi ditentukan di antara karakter-karakter yang dimiliki oleh dua atau lebih organism (Felsenstein, 2004).

Taksonomi numerik diawali dengan analisis karakter yang diuji dengan berbagai uji, antara lain: uji morfologi, fisiologi dan sifat biokimiawi yang menghasilkan data fenotip yang beragam. Data fenotip yang didapat akan diolah lebih lanjut sehingga menghasilkan koefisien similaritas, yaitu sebuah fungsi yang mengukur tingkat kemiripan yang dimiliki oleh dua atau lebih strain mikroba yang dibandingkan, diperoleh dari karakter yang dibandingkan antar dua atau lebih strain mikroba. Similaritas dapat dinyatakan dalam derajat similaritas, salah satu metode untuk menentukan derajat similaritas adalah phenogram atau dendogram (Maghfiroh, 2010). *Cladistic analysis* merupakan suatu analisis yang digunakan dalam klasifikasi suatu organisme berdasarkan pada persamaan anatomi eksternal maupun internal, fungsi fisiologis, genetik, ataupun sejarah evolusinya. (Suharjono, 2008).

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Saluran pencernaan kelinci muda mengandung mikroflora normal yang belum seimbang. Ketidakseimbangan mikroflora pada saluran pencernaan dapat mengakibatkan gangguan salah satunya enteritis. Pemberian probiotik dapat membantu menyeimbangkan mikroflora saluran pencernaan. Pada saluran cerna kelinci terdapat berbagai macam mikroflora. Jejunum kelinci memiliki tugas utama memecah nutrisi, berfungsi menyerap protein dan karbohidrat serta merupakan tempat kaya nutrisi sesuai dengan yang dibutuhkan mikroflora *indigenous* untuk tumbuh. Salah satu bagian dari bakteri *indigenous* pada jejunum adalah bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat merupakan salah satu jenis bakteri

yang umum digunakan sebagai probiotik. Bakteri asam laktat dalam usus akan membantu memecah makanan, mencegah pertumbuhan bakteri patogen penyebab penyakit, dan mampu memproduksi asam laktat yang dapat meningkatkan jumlah bakteri *indigenous* pada saluran pencernaan. Mikroba yang terdapat pada jejunum kelinci belum diketahui sepenuhnya. Untuk itu perlu dilakukan isolasi dan identifikasi terhadap bakteri asam laktat yang ada di dalam jejunum kelinci, sehingga diperoleh data ilmiah tentang jenis bakteri asam laktat dalam jejunum dan mendapatkan isolatnya. Kemudian, dari data yang diperoleh dapat digunakan sebagai informasi awal untuk pengujian *in-vitro* sebagai kandidat probiotik. Pengujian *in-vitro* meliputi pengujian kemampuan hidup pada pH rendah dan pengujian kemampuan tumbuh pada media yang mengandung garam empedu. Penelitian ini diharapkan mampu mengungkap hal yang baru dimana bakteri yang ditemukan dari jejunum kelinci dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik.

3.2 Hipotesis Penelitian

Terdapat beberapa jenis bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai kandidat probiotik yang tahan terhadap pH rendah (asam) dan garam empedu pada hasil isolasi jejunum kelinci.

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium LSIH Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Mikrobiologi FKH Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kesmavet FKH Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Bioteknologi FTP Universitas Brawijaya Malang. Pelaksanaan penelitian ini berlangsung mulai bulan September 2015-April 2016.

4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel jejunum dari kelinci New Zealand White (*Oryctolagus cuniculus*) yang berusia kurang lebih 5 minggu diambil dari peternakan kelinci Karangploso-Malang. Pengambilan sampel dilakukan dengan 3 kali ulangan menggunakan 3 ekor kelinci, dan sampel yang diambil pada setiap ulangan dilakukan duplo. Sampel yang didapat kemudian dibilas dan dikerok. Sampel bilasan didapatkan dengan cara membilas jejunum menggunakan *buffer pepton water* (BPW) 0,1%, sampel yang diambil dilakukan duplo sebanyak 1 ml secara aseptis. Sampel kerokan didapatkan dengan cara mengerok dinding mukosa jejunum bagian dalam setelah pembilasan, sampel yang diambil dilakukan duplo sebanyak 1 gram secara aseptis.

4.3 Alat dan Bahan

4.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: sarung tangan, masker, ose, bunsen, *cotton swab*, *backer glass*, gelas ukur (*pyrex*),

automatic micropipete volume 200 µl- 1000 µl (Boeco Jerman), Laminar Air Flow (LAF) (Nuair Labgard Class II), blue tip, timbangan (Metter toledo), alumunium foil, plastic wrap, inkubator (Memmert), cawan petri, tabung reaksi, refrigerator, scalpel, pinset, spektrofotometer (Genesys 20), gunting bedah, kapas, tabung erlenmayer, mikroskop cahaya (Olympus TL2), obyek glass, cover glass, autoclave model 25X, tabung durham, tabung falcon, container, pengaduk kaca dan parafin, tusuk gigi, colony counter, pH meter, vortex (Maxi Mix II), foto digital mikroskopik (Olympus CX41) dan waterbath (Memmert).

4.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang dibutuhkan pada penelitian ini antara lain MRSA (*deMan Rogosa and Sharp Agar; Oxoid*), MRSB (*deMan Rogosa and Sharp Broth, Oxoid*), CaCO₃ 1%, alkohol 70%, *Buffered Pepton Water (BPW) (Merck)*, minyak emersi, *aquadest*, kloroform, reagen H₂O₂ 3%, garam empedu sintetik (*oxgall*) 0,3%, gliserol 60% dan pewarnaan gram (*kristal violet, lugol, alkohol-aseton dan safranin*), media SIM (*Sulfit Indol Motility*) semi padat, kit oksidase (*Oxoid*), *nitrate broth*, larutan dimetil alpa-naphtylamin, *tryptone broth, Starch agar*, media O/F (oksidatif fermentatif), HCL, media uji gula-gula (*phenol red, pepton, gula arabinosa, galaktosa, laktosa, maltosa, manitol, salicin, sorbitol, sukrosa, dan glukosa*).

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental laboratory* secara deskriptif. Isolasi bakteri asam laktat asal jejunum kelinci dilakukan dengan 2 sampel yaitu bilasan dan kerokan. Identifikasi bakteri dilakukan terhadap isolat

yang diperoleh, berpedoman pada buku *Bergey's Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) dengan melakukan serangkaian uji morfologi yang meliputi uji pewarnaan gram dan pewarnaan spora, uji fisiologi yang meliputi uji katalase, uji pertumbuhan pada suhu tertentu dan uji motilitas, serta uji biokimia yang meliputi uji oksidase, uji reduksi nitrat, uji hidrolisis pati, uji oksidatif fermentatif, uji fermentasi gula-gula dan uji indol. Hasil isolasi bakteri asam laktat kemudian dilakukan karakterisasi, uji potensi ketahanan asam dan ketahanan terhadap garam empedu untuk mengetahui potensi isolat sebagai probiotik.

4.5 Tahapan Penelitian

Penelitian ini terbagi menjadi 3 tahapan utama, yaitu :

1. Isolasi bakteri dari jejunum kelinci.
2. Karakterisasi isolat bakteri berdasarkan sifat morfologi, fisiologi, dan biokimia.
3. Uji potensi bakteri asam laktat sebagai kandidat probiotik berdasarkan ketahanan terhadap asam dan ketahanan terhadap garam empedu.

4.5.1 Persiapan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara kelinci diterminasi menggunakan *chloroform* 10% dalam wadah yang tertutup, kelinci kemudian dipastikan mati dengan melihat reflek pupil mata terhadap cahaya. Kelinci di *preparasi* pada meja dengan meletakan secara rebah *dorsal*, agar tidak bergeser, difiksasi telapak kaki depan dan belakang kelinci. Incisi dimulai dari dinding abdomen. Kulit dan muskulus diincisi sehingga terlihat organ pencernaan dan terlihat jejunum. Jejunum kemudian

dipotong lalu dibelah hingga mukosa terlihat. Sampel yang diambil berupa bilasan mukosa dan kerokan jejunum kelinci (Amelia dkk., 2012).

Sampel yang didapat kemudian dilakukan pengenceran berseri. Jejunum yang telah dikeluarkan isinya selanjutnya dibilas dengan 9 ml BPW 0,1%, air bilasan jejunum kemudian diambil 1 ml untuk dilakukan pengenceran berseri hingga 10^{-5} (Sujaya dkk., 2008). Preparasi sampel jejunum berupa kerokan didapat dengan cara mengerok jejunum kemudian diambil 1 gram dan ditambahkan pada 9 ml BPW 0,1%, setelah itu dihomogenkan menggunakan *tube shaker* dan dilakukan pengenceran berseri hingga 10^{-5} (Anastiawan, 2014).

4.5.2 Isolasi Bakteri dari Jejunum Kelinci

Hasil pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} dari sampel bilasan dan kerokan ditanam dengan metode *pour plate* pada media MRSA+CaCO₃ 1% (Khunajakr *et al.*, 2008). Media MRSA yang digunakan adalah 68,2 gr / 1 liter air, kemudian diinkubasi dengan suhu 40°- 43°C selama 24 jam. Koloni yang menunjukkan adanya *clearing zone* mengindikasikan bahwa koloni tersebut merupakan bakteri asam laktat. Jumlah koloni yang tumbuh pada media kemudian dihitung (Anastiawan, 2014).

4.5.3 Total Plate Count (TPC)

Hasil koloni yang tumbuh pada media dihitung menggunakan *Colony counter* dengan cara mengalikan jumlah koloni rata-rata dengan faktor pengenceran yang digunakan (satuan cfu/ml). Total koloni yang dihitung harus memenuhi standar *International Commission Microbiology Food*

(ICMF) yaitu antara 30 sampai 300 koloni per cawan petri (Pelczar dan Chan, 2008).

$$\text{Jumlah bakteri } \left(\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right) = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

4.5.4 Seleksi dan Pemurnian Bakteri Asam Laktat

Tahap awal pemurnian dimulai dengan memilih koloni tunggal yang tumbuh pada media hasil isolasi, target pemurnian bakteri adalah koloni yang memiliki morfologi koloni berbeda, harus bersifat katalase negatif dan termasuk bakteri Gram positif. Pemurnian bakteri dilakukan dengan goresan kuadran pada media MRSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam, penggoresan dilakukan berkali-kali hingga didapatkan koloni tunggal (Waluyo, 2008). Koloni dari kultur murni selanjutnya diamati morfologinya. Setelah diamati morfologinya, koloni kemudian diinokulasikan pada medium MRSA miring sebagai *stock culture* dan sebagai persiapan uji penelitian lebih lanjut.

4.5.5 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan cara mengambil 1 atau 2 ose koloni dan diletakkan di atas gelas obyek, kemudian ditambahkan 1 tetes larutan H₂O₂ 3%. Bakteri yang bersifat katalase positif ditandai oleh pembentukan gelembung udara pada koloni dan sekitarnya (Barrow *and* Feltham, 1993). Bakteri asam laktat termasuk bakteri katalase negatif sehingga hasil reaksi uji katalase seharusnya tidak terbentuk gelembung udara.

4.5.6 Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Pada penelitian ini, karakterisasi terhadap isolasi bakteri asam laktat berpedoman pada buku *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria* (Barrow and Feltham, 1993) yang bertujuan untuk mengetahui sifat morfologi, fisiologi dan biokimia.

4.5.6.1 Morfologi

- Pewarnaan Gram

Gelas objek dibersihkan dengan alkohol 70% dan dibilas dengan *aquadest*, kemudian difiksasi di atas api bunsen. Diambil secara aseptik 1 ose biakan bakteri dari stok, diratakan pada kaca objek dan difiksasi di atas api bunsen. Kemudian ditetesi dengan larutan kristal violet dan didiamkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya ditetesi dengan larutan iodium dan dibiarkan selama 2 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Kemudian dicuci dengan larutan pemucat selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu ditetesi dengan larutan safranin atau zat penutup dan didiamkan selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya diamati dengan menggunakan mikroskop pada pembesaran kuat. Indikasi pewarnaannya yaitu bakteri Gram positif akan berwarna violet dan bakteri Gram negatif akan berwarna merah, di amati juga bentuk dari sel bakteri tersebut apakah bulat (*coccus*), batang (*basil*), maupun bergelombang (*spiral*) (Waluyo, 2008).

- Pewarnaan spora

Pewarnaan spora dilakukan dengan cara biakan bakteri diambil menggunakan ose, kemudian dioleskan di gelas objek dan ditunggu hingga kering. Setelah kering kemudian difiksasi di atas api hingga bakteri melekat pada kaca objek. Bakteri kemudian ditetesi *malachite green* kurang lebih 10 menit, setelah itu dicuci dengan *aquadest*. Bakteri kemudian ditetesi safranin selama 1 menit, lalu dibilas, dikeringkan dan diamati dibawah mikroskop (Waluyo, 2008).

4.5.6.2 Fisiologi

- Pengujian pertumbuhan bakteri asam laktat pada berbagai suhu

Uji kemampuan tumbuh dilakukan pada suhu 15°C, 37°C, dan 45°C. Isolat bakteri asam laktat ditumbuhkan menggunakan media *MRS broth* dalam tabung reaksi selama 24 jam. Hasil menandakan positif apabila terjadi pertumbuhan bakteri pada medium setelah inkubasi (Barrow *and* Feltham, 1993).

- Motilitas

Sebanyak 1 ose (ose lurus) isolat dari stok kultur diinokulasikan dengan cara ditusukkan pada medium *SIM (Sulfit Indol Motility)* tegak, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif 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 (Barrow *and* Feltham, 1993).

4.5.6.3 Biokimia

- Uji oksidase

Uji oksidase dilakukan dengan cara menyiapkan *obyek glass* yang telah dibersihkan dengan tisu beralkohol dan kit oksidase. Pengujian dilakukan dengan mengambil biakan sebanyak 1 ose menggunakan tusuk gigi, kemudian mengoleskan biakan tersebut pada kit oksidase yang ada di *obyek glass*. Hasil uji oksidase positif jika muncul warna merah muda, merah tua, merah gelap dan akhirnya menjadi warna biru kehitaman pada olesan biakan. Sedangkan uji negatif jika tidak terjadi perubahan warna (Barrow *and* Feltham, 1993).

- Uji reduksi nitrat

Satu ose koloni bakteri ke dalam *nitrate broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Selanjutnya ditambahkan tiga tetes larutan asam sulfanilat dan tiga tetes larutan *dimetil alpa-naphtylamin*. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya cincin warna merah di permukaan media yang menunjukkan bakteri dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit. Sedangkan hasil negatif jika tidak terjadi perubahan warna (Barrow *and* Feltham, 1993).

- Uji hidrolisis pati

Isolat bakteri diinokulasikan pada media *starch agar* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, ditambahkan beberapa tetes larutan iodium/lugol pada koloni isolat bakteri yang tumbuh. Hasil positif apabila di sekeliling koloni terbentuk zona bening yang menandakan

terjadinya proses hidrolisis pati, sedangkan hasil negatif di sekeliling koloni terbentuk warna biru kehitaman (Barrow *and* Feltham, 1993).

- Uji oksidatif-fermentatif

Uji oksidatif-fermentatif menggunakan medium O/F. Bakteri yang akan diuji, secara aseptis dengan menggunakan loop ditusukkan ke dalam medium tegak O/F yang sudah disiapkan terlebih dahulu. Setiap bakteri yang akan diuji ditusukkan ke dalam dua tabung, dimana tabung pertama ditutupi dengan parafin 3-5 ml, sedangkan tabung kedua tanpa parafin. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 48 jam. Bakteri bersifat fermentatif jika media pada kedua tabung berwarna kuning. Bakteri bersifat oksidatif jika perubahan warna kuning ditunjukkan pada tabung tanpa paraffin. Hasil uji oksidatif-fermentatif bersifat negatif jika tidak ada perubahan warna (Barrow *and* Feltham, 1993).

- Uji fermentasi gula-gula

Media pada uji gula-gula terpisah menjadi 9 tabung yang berbeda dan media yang digunakan pada uji ini adalah masing-masing gula dengan konsentrasi 1% dalam pepton. Di dalam media gula-gula ditambahkan indikator *phenol red*. Isolat bakteri diambil dengan ose steril kemudian diinokulasikan pada masing-masing media yaitu arabinosa, galaktosa, laktosa, maltosa, manitol, salicin, sorbitol, sukrosa dan glukosa dalam tabung reaksi berisi tabung durham. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Interpretasi hasil pada uji ini adalah negatif apabila tidak terjadi perubahan warna, positif apabila terjadi perubahan warna, positif + gas apabila terjadi perubahan warna dan terdapat gas pada tabung durham

(gas yang diperhitungkan minimal 10% dari tinggi tabung durham) (Barrow *and* Feltham, 1993).

- Uji Indol

Isolat bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose, kemudian diinokulasi ke dalam media *tryptone broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi ditambahkan 5 tetes (0,5 ml) reagen *Kovacs*. Uji positif ditandai dengan terbentuknya lapisan berwarna merah di bagian atas biakan setelah 1 menit. Sedangkan uji negatif jika tidak terjadi perubahan warna (Barrow *and* Feltham, 1993).

4.5.7 Analisis Similaritas dengan Menggunakan Program CLAD97

Pembuatan pohon filogenetik menggunakan program CLAD97 dilakukan dengan cara (Benson, 2002):

1. Data yang telah didapatkan dalam uji karakter morfologi, fisiologi dan biokimiawi dari isolat bakteri asam laktat dikompilasi menggunakan Microsoft Excel. Data karakteristik fenotip dengan tanda plus (+) menyatakan bahwa isolat memiliki karakter dari masing-masing uji dan tanda minus (-) menyatakan hal sebaliknya.
2. Data kemudian dikonversi kedalam bentuk angka 1 untuk hasil uji yang memiliki nilai (+), dan angka 0 untuk hasil uji yang memiliki nilai (-).
3. Data yang telah diubah kemudian diolah menggunakan CLAD97, yaitu dengan cara memasukkan data ke dalam notepad, dimana data tersebut diawali dengan jumlah spesies, jumlah karakter dan tanda bintang yang kemudian masing-masing strain beserta jenis

karakternya (**Lampiran 5**), dimasukkan juga data beberapa bakteri pembanding dengan karakter sesuai dengan uji pada isolat yang dapat dilihat pada Barrow *and* Feltham (1993).

4. Data yang telah dimasukkan dalam notepad, kemudian disimpan dengan langkah klik *file* kemudian pilih *open*. Selanjutnya klik file **txt* yang telah tersimpan dalam format, kemudian muncul tulisan “*which one to construct*” dan dipilih *construct fenetic*, klik ok.
5. Tabel dendogram kemudian muncul, setelah itu klik *view*, tulisan output dihilangkan. Sehingga didapatkan pohon filogenetik dan diubah dengan nama isolat yang telah ditentukan kemudian di *printscreen*.
6. Nilai similaritas berkisar antara 0 sampai 1,0 dan hubungan kekerabatan makin dekat bila nilai similaritas makin dekat dengan 1.

4.5.8 Uji Potensi Probiotik

4.5.8.1 Uji Ketahanan terhadap Asam Lambung

Uji ketahanan terhadap asam lambung dilakukan menggunakan medium MRSB yang ditambahkan HCL sehingga pH mencapai 2 disesuaikan dengan pH lambung. Isolat bakteri asam laktat diinokulasikan pada media dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 3-6 jam. Interpretasi hasil dibaca dengan melihat tingkat kekeruhan menggunakan spektrofotometer berdasarkan nilai OD pada $\lambda = 600\text{nm}$, kemudian isolat ditanamkan kembali pada media MRSA menggunakan metode *pour plate* dengan suhu inkubasi 37°C selama 24-48 jam untuk membuktikan adanya

pertumbuhan. Pembacaan hasil positif apabila terlihat pertumbuhan pada isolat media MRSA yang telah diinkubasi serta terlihat peningkatan nilai OD (Barrow *and* Feltham, 1993).

4.5.8.2 Uji Ketahanan terhadap Garam Empedu

Uji ketahanan terhadap garam empedu dilakukan menggunakan medium MRSB yang ditambah dengan *oxgall* (garam empedu sintetik) 0,3%, yang disesuaikan dengan kadar garam empedu pada saluran pencernaan. Isolat bakteri asam laktat diinokulasikan pada media dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-6 jam. Pengamatan pertumbuhan isolat dinyatakan dengan tingkat kekeruhan menggunakan spektrofotometer berdasarkan nilai OD pada $\lambda = 600$ nm. Isolat kemudian ditanamkan kembali pada media MRSA menggunakan metode *pour plate* dengan suhu inkubasi 37°C selama 24-48 jam untuk membuktikan adanya pertumbuhan. Interpretasi hasil yang menandakan positif akan terlihat dengan peningkatan nilai OD dan pertumbuhan isolat pada media MRSA setelah inkubasi (Barrow *and* Feltham, 1993).

4.6 Analisis Data

Dalam penelitian ini dilakukan analisis deskriptif kualitatif dari hasil karakterisasi fenotip yaitu mengetahui potensi bakteri asam laktat dengan mengamati ketahanan hidup bakteri asam laktat. Penentuan isolat bakteri asam laktat sebagai kandidat probiotik dengan menentukan beberapa isolat yang mampu beradaptasi dengan baik pada masing-masing variabel pengamatan.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Jumlah Bakteri Asam Laktat pada Jejunum Kelinci

Rata-rata jumlah bakteri asam laktat (cfu/ml) pada sampel bilasan dan kerokan jejunum kelinci menunjukkan hasil yang berbeda nyata (**Tabel 5.1**). Hasil analisis data rata-rata jumlah bakteri asam laktat menggunakan uji *independent t-test* secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 2** dan **Lampiran 4**.

Tabel 5.1 Rata-rata jumlah bakteri asam laktat pada jejunum kelinci

Sampel	Rata-rata Jumlah Bakteri Asam Laktat (10 ⁴ cfu/ml)
Bilasan	2,81 ± 1,37
Kerokan	4,88 ± 2,95*

Keterangan: * : menunjukkan berbeda nyata

Berdasarkan **Tabel 5.1** diketahui bahwa pada sampel kerokan jejunum kelinci dari tiga kali ulangan memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri asam laktat yang terdapat pada sampel bilasan jejunum kelinci. Nilai rerata pada sampel kerokan yang lebih tinggi mengindikasikan bahwa bakteri asam laktat pada kerokan jejunum lebih mampu menempel dan berkolonisasi pada epitel mukosa usus. Jumlah bakteri asam laktat pada bilasan jejunum lebih sedikit diduga disebabkan karena bakteri hanya mampu menempel pada permukaan mukosa. Bakteri asam laktat yang menempel pada permukaan mukosa umumnya bersifat sementara (transit).

Menurut Sopandi dan Wardah (2014) bakteri pada usus terdiri dari dua jenis, yaitu bakteri indigenous dan bakteri transit. Bakteri transit hanya melewati atau menempel sementara pada tempat hidup bakteri indigenous, sedangkan

bakteri indigenous dapat menempel kuat pada dinding usus dan memelihara kondisi lingkungan usus. Kemampuan menempel bakteri asam laktat pada epitel mukosa usus/saluran pencernaan merupakan salah satu kriteria utama seleksi terhadap bakteri asam laktat yang digunakan sebagai probiotik (Ouwehand dkk., 2002; FAO/WHO, 2002; Arief dkk., 2010).

5.2 Karakteristik Bakteri Asam Laktat pada Jejunum Kelinci

Berdasarkan hasil uji morfologi isolat bakteri asam laktat asal jejunum kelinci diperoleh 12 isolat bakteri yang memiliki karakteristik secara makroskopik berbeda. Kemudian dari hasil uji *screening* dengan uji katalase dan pewarnaan gram (**Lampiran 3**) didapatkan 5 isolat bakteri asam laktat terpilih (AKa, ABb, BKb, BBa dan CKa) yang memiliki ciri-ciri seperti pada **Tabel 5.2**.

Tabel 5.2 Morfologi koloni dan sel bakteri asam laktat asal jejunum kelinci

Kode Isolat	Morfologi koloni				Morfologi sel		
	Bentuk	Tepi	Warna	Elevasi	Bentuk	Gram	Katalase
AKa	Bulat	Rata	Krem	Cembung	Batang	+	-
ABb	Bulat	Rata	Putih	Cembung	Batang	+	-
BKb	Bulat	Rata	Putih	Cembung	Batang	+	-
BBa	Bulat	Rata	Krem	Cembung	Batang	+	-
CKa	Bulat	Rata	Putih	Cembung	Batang	+	-

Keterangan : Positif (+); Negatif (-)

Berdasarkan **Tabel 5.2** diketahui bahwa kelima isolat bakteri terpilih terdiri dari tiga isolat asal kerokan (AKa, BKb dan CKa) dan dua isolat asal bilasan (ABb dan BBa). Pada hasil uji pewarnaan Gram, didapatkan bahwa kelima isolat bakteri termasuk Gram positif yang ditandai dengan sel bakteri berwarna ungu. Pewarnaan Gram merupakan salah satu teknik pewarnaan yang paling penting dan sering digunakan untuk pengujian kemurnian suatu bakteri. Pada pewarnaan Gram, bakteri dibedakan menjadi dua kelompok berdasarkan

susunan dinding selnya yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif (Pelczar dan Chan, 2008).

Sedangkan pada hasil uji katalase didapatkan bahwa kelima isolat bakteri bersifat katalase negatif yang ditunjukkan dengan tidak adanya gelembung gas berisi oksigen ketika isolat ditetesi dengan larutan H₂O₂. Hal ini sesuai dengan penelitian Ernawati (2008) yang menyatakan bahwa bakteri asam laktat termasuk bakteri dengan katalase negatif. Pengujian katalase bertujuan untuk mengetahui keberadaan enzim katalase yang terdapat pada isolat bakteri. Menurut Savadago *et al.* (2006) bakteri asam laktat adalah sekelompok bakteri Gram positif, katalase negatif, berbentuk basil dan bulat, bersifat non motil serta tumbuh pada kondisi anaerob. Bakteri asam laktat yang berbentuk batang tergolong pada genus *Lactobacillus* dan yang berbentuk bulat tergolong pada genus *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* dan *Pediococcus* (Dwidjoseputro, 2005).

5.3 Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Jejunum Kelinci

5.3.1 Berdasarkan Sifat Morfologi, Fisiologi dan Biokimia

Hasil pengamatan karakterisasi pada isolat terpilih berdasarkan perbandingan sifat fenotip isolat dengan sifat bakteri pembanding yang berpedoman pada Barrow *and* Feltham (1993) ditampilkan pada **Tabel 5.3.**

Tabel 5.3 Karakteristik 5 isolat bakteri asam laktat terpilih

Karakteristik Fenotip	Kode Isolat				
	AKa	ABb	BKb	BBa	CKa
Gram	+	+	+	+	+
Spora	-	-	-	-	-
Suhu 15 °C	-	+	+	-	+
Suhu 37 °C	+	+	+	+	+
Suhu 45 °C	+	+	+	+	+
Katalase	-	-	-	-	-
Motilitas	-	-	-	-	-
Oksidase	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
Reduksi nitrat	-	-	-	-	-
Hidrolisis pati	-	-	-	-	-
O/F	F	F	F	F	F
Glukosa	-	+	+	-	+
Maltosa	+	+	+	+	+
Laktosa	+	+	+	+	+
Galaktosa	+	+	+	+	+
Sukrosa	+	+	+	+	+
Arabinosa	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+
Manitol	-	+	+	-	+
Sorbitol	-	+	+	-	+
Pendugaan Genus Menurut Barrow and Feltham (1993)	<i>Lactobacillus</i> sp				

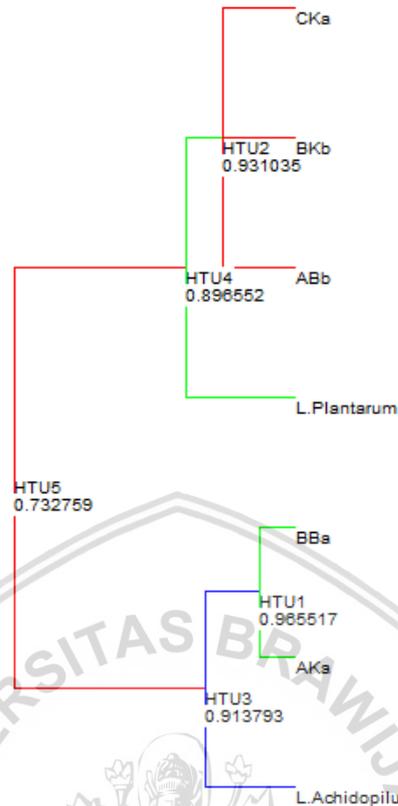
Keterangan: O: Oksidatif; F: Fermentatif; (+): reaksi positif; (-): reaksi negatif

Berdasarkan **Tabel 5.3** diketahui bahwa kelima isolat yaitu AKa, ABb, BKb, BBa, dan CKa memiliki karakteristik mendekati genus *Lactobacillus* sp. dengan ciri-ciri berbentuk batang, Gram positif, katalase negatif, tidak motil, oksidase positif, dan tidak berspora. Menurut Ray dan Bhunia (2008), bakteri *Lactobacillus* sp. umumnya tidak bergerak, anaerob fakultatif, koloni dalam media agar berukuran 2-5 mm, konfeks, opak,

sedikit transparan, tidak berpigmen dan metabolit utamanya adalah asam laktat. Tumbuh baik pada suhu 25-40 °C, bakteri ini menetap dalam saluran pencernaan unggas dan mamalia.

5.3.2 Berdasarkan Uji Similaritas Menggunakan Program CLAD97

Pendugaan isolat bakteri asam laktat hasil karakterisasi dilakukan dengan uji similaritas masing-masing isolat yang disajikan dalam bentuk dendogram menggunakan *Software CLAD97*. Analisis similaritas bakteri sesuai dengan sifat fenotipnya harus dilakukan dengan serangkaian uji pendukung yaitu uji karakterisasi morfologi, fisiologi dan biokimia. Uji similaritas berfungsi untuk mengetahui jarak kedekatan antar isolat bakteri asam laktat hasil isolasi dengan isolat bakteri asam laktat acuan. Nilai similaritas mendekati 1 menunjukkan bahwa ada kemungkinan isolat tersebut dari genus dan spesies yang sama. Suatu isolat dapat dikatakan memiliki spesies yang berbeda jika memiliki nilai similaritas kurang dari 0,7. Sedangkan isolat yang memiliki nilai similaritas lebih dari 0,7 maka dapat dikatakan sebagai satu spesies (Heni, 2012). Berdasarkan nilai similaritas diperoleh 5 isolat bakteri asam laktat yang dikelompokkan kedalam 2 kelompok bakteri dengan spesies berbeda seperti pada **Gambar 5.1**.



Gambar 5.1 Dendogram uji similaritas hubungan kekerabatan 5 isolat bakteri asam laktat asal jejunum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*).

Berdasarkan **Gambar 5.1**, dapat dianalisis bahwa terdapat 2 kelompok isolat bakteri asam laktat dengan spesies yang berbeda. Isolat BBa merupakan satu spesies dengan isolat AKa dengan nilai HTU (*Hypothetical Taxon Unit*) 0,96, Sedangkan isolat CKa, BKb dan ABb merupakan satu spesies dengan nilai HTU 0,93. Isolat BBa dan AKa memiliki kekerabatan dengan *L. Acidophilus* karena memiliki nilai HTU sebesar 0,91, dan untuk isolat CKa, BKb serta ABb memiliki kekerabatan dengan *L. Plantarum* karena memiliki nilai HTU sebesar 0,89.

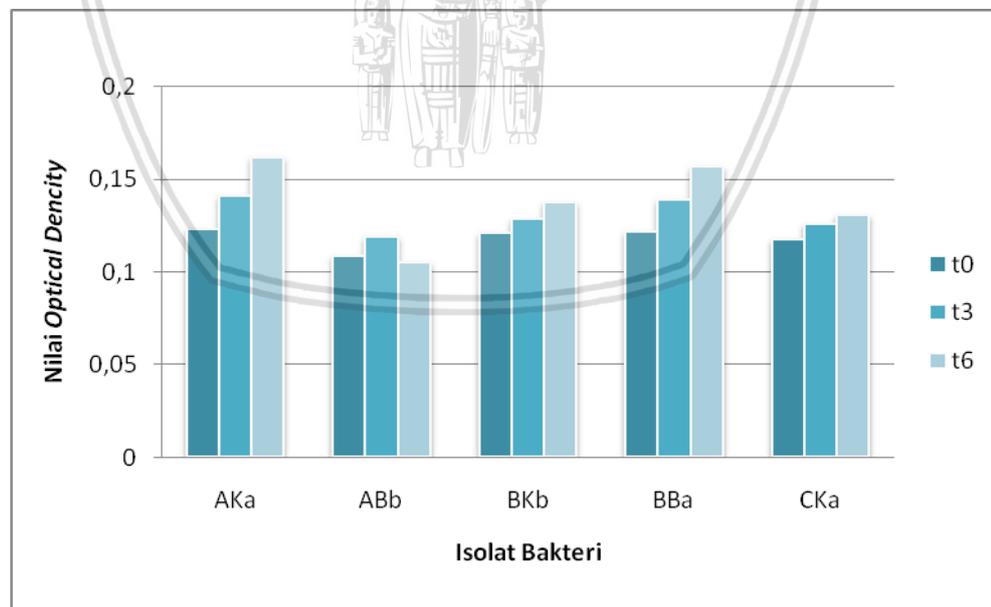
Menurut Benson (2002), nilai similaritas berkisar antara 0 sampai 1,0 dan hubungan kekerabatan makin dekat apabila nilai similaritas

semakin dekat dengan 1. Koloni bakteri asam laktat genus *Lactobacillus* memang banyak ditemukan pada saluran pencernaan hewan (Dibner and Richard, 2005; Carol *et al.*, 2011).

5.4 Uji Potensi Bakteri Asam Laktat Sebagai Kandidat Probiotik

5.4.1 Ketahanan terhadap Asam Lambung

Uji ketahanan isolat bakteri asam laktat terhadap pH lambung dilakukan dengan pengukuran nilai *Optical Dencity* (OD) berdasarkan kemampuan pertumbuhan bakteri asam laktat pada pH 2 (pH lambung). Uji ketahanan bakteri asam laktat asal jejunum kelinci dilakukan selama 3-6 jam karena disesuaikan dengan waktu transit makanan dalam lambung (Delaney, 2006). Nilai OD pada kelima isolat bakteri asam laktat disajikan pada **Gambar 5.2**.



Gambar 5.2 Kemampuan pertumbuhan bakteri asam laktat pada pH 2

Keterangan: t₀ : sebelum inkubasi; t₃: setelah 3 jam inkubasi; t₆: setelah 6 jam inkubasi

Berdasarkan **Gambar 5.2**, terdapat peningkatan nilai OD isolat bakteri asam laktat dari sebelum inkubasi (t_0), jam ke 3 (t_3) dan setelah inkubasi 6 jam (t_6) kecuali pada isolat ABb. Peningkatan nilai OD menunjukkan bahwa bakteri asam laktat yang diisolasi dari jejunum kelinci dapat bertahan pada kondisi pH rendah (pH 2). Isolat AKa, BBa, BKb dan CKa dapat bertahan hidup dan tumbuh pada kondisi asam, sedangkan isolat ABb mengalami penurunan setelah jam ke- 6. Semua bakteri yang berhasil bertahan pada kondisi pH rendah, maka bakteri tersebut dinyatakan bersifat tahan/ resisten terhadap asam (Sunaryo, 2011). Penurunan nilai OD menunjukkan bahwa isolat ABb tidak mampu bertahan pada pH rendah setelah jam ke 6 .

Penurunan jumlah bakteri pada pH rendah (pH 2) dapat disebabkan karena kondisi yang sangat asam dapat mengakibatkan kerusakan membran dan lepasnya komponen intraseluler yang dapat menyebabkan kematian. Bakteri yang tahan asam memiliki ketahanan lebih besar terhadap kerusakan membran akibat penurunan pH ekstraseluler dibandingkan dengan bakteri yang tidak tahan terhadap asam. Komposisi penyusun membran yang beragam di antara spesies bakteri juga diduga mempengaruhi keragaman ketahanan bakteri terhadap pH rendah (Susanti dkk., 2007).

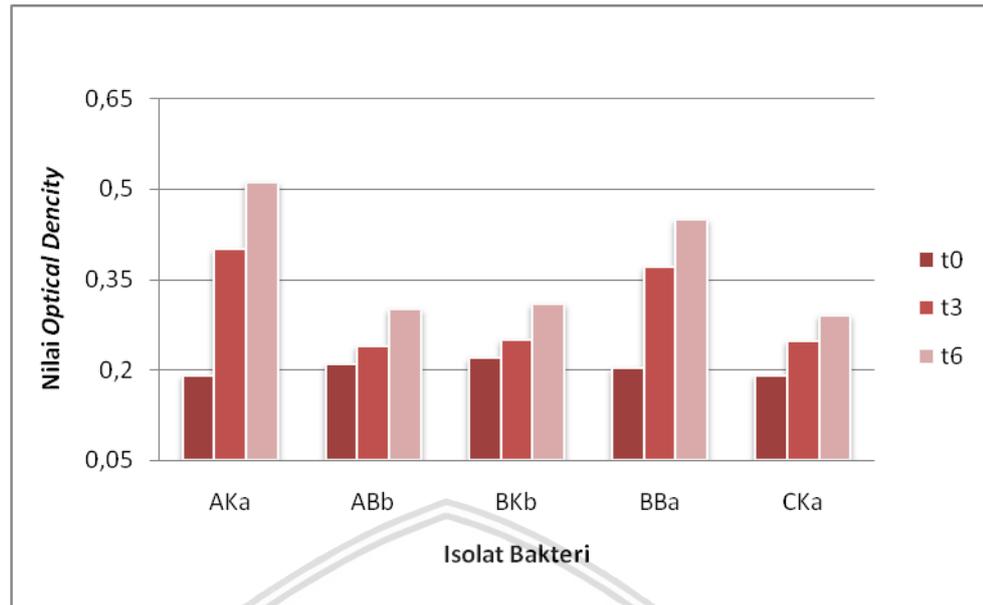
Suatu bakteri dapat dikatakan sebagai bakteri probiotik apabila bakteri tersebut masih aktif pada kondisi asam lambung. Stress pertama pada sel bakteri yang memasuki saluran pencernaan adalah terpapar pada asam lambung. Pada saat keadaan istirahat, pH lambung sangatlah rendah yaitu sekitar 2 (Sunaryo, 2011). Kebanyakan bakteri asam laktat pada kondisi pH

rendah tidak hanya tumbuh lambat tetapi juga mengalami kerusakan dan menurunnya viabilitas. Toleransi relatif dari mikroorganisme terhadap lingkungan asam tergantung dari galur bakteri tersebut (Susanti dkk., 2007).

Berdasarkan hasil pengujian ketahanan terhadap pH asam menunjukkan bahwa Isolat AKa dan BBa (diduga *L. Acidophilus*) dan Isolat BKb dan CKa (diduga *L. Plantarum*) yang diisolasi dari jejunum kelinci berpotensi sebagai kandidat probiotik karena mampu tumbuh pada kisaran pH asam (Bhardwaj *et al.*, 2012; Khem *et al.*, 2015). Isolat ABb tidak berpotensi sebagai kandidat probiotik karena tidak tahan dengan pH rendah setelah jam ke-6. Isolat AKa dan BBa adalah isolat bakteri asam laktat terbaik pada uji ketahanan terhadap pH rendah (asam), karena mengalami kenaikan pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya.

5.4.2 Ketahanan terhadap Garam Empedu

Uji ketahanan isolat bakteri asam laktat terhadap garam empedu dilakukan dengan pengukuran nilai *Optical Density* (OD). Nilai OD pada kelima isolat bakteri dapat dilihat pada **Gambar 5.3**.



Gambar 5.3 Kemampuan pertumbuhan bakteri asam laktat pada garam empedu

Keterangan: t₀ : sebelum inkubasi; t₃: setelah 3 jam inkubasi; t₆: setelah 6 jam inkubasi

Berdasarkan **Gambar 5.3**, terdapat peningkatan nilai OD pada isolat bakteri asam laktat dari sebelum inkubasi (t₀), jam ke 3 (t₃) dan setelah inkubasi 6 jam (t₆). Peningkatan nilai OD menunjukkan bahwa bakteri asam laktat yang diisolasi dari jejunum kelinci dapat bertahan terhadap cairan garam empedu, sehingga dapat melewati saluran pencernaan terutama usus yang merupakan tempat garam empedu disekresikan. Kelima isolat yaitu AKa, BBa, BKb, CKa, dan ABb dapat bertahan hidup dan tumbuh dengan adanya penambahan garam empedu. Isolat AKa yang diduga *L. Acidophilus* memiliki ketahanan paling tinggi daripada isolat lain.

Salah satu dari beberapa syarat yang harus dipenuhi bakteri asam laktat agar dapat berfungsi sebagai bakteri probiotik adalah tahan terhadap garam empedu dan mampu hidup selama berada pada bagian atas usus halus. Cairan empedu bersifat bakterisidal bagi mikroorganisme dalam

tubuh kecuali beberapa genus bakteri penghuni usus yang tahan terhadap empedu. Ketahanan terhadap garam empedu merupakan karakteristik yang penting bagi bakteri asam laktat dan berpengaruh terhadap aktivitas dalam saluran pencernaan, terutama pada usus bagian atas tempat empedu disekresikan. Apabila bakteri tidak mampu bertahan pada garam empedu, maka akan ditunjukkan dengan tidak dijumpainya populasi bakteri pada kondisi tersebut. Semua mikroba yang berhasil hidup setelah ditumbuhkan dalam MRSA dengan tambahan 0,3% *oxgall*, dinyatakan bersifat tahan terhadap garam empedu. Konsentrasi garam empedu sebesar 0,3% merupakan konsentrasi yang kritikal, nilai yang cukup tinggi untuk melakukan seleksi terhadap isolat yang resisten terhadap garam empedu (Sunaryo, 2011).

Penurunan jumlah bakteri dapat disebabkan karena garam empedu berpengaruh terhadap permeabilitas pada membran sel bakteri. Pada bakteri yang tidak tahan garam empedu, perubahan permeabilitas sel dan kebocoran materi intraseluler lebih besar, sehingga sel bakteri dapat mengalami kematian akibat lisis. Keragaman struktur asam lemak pada membran sitoplasma bakteri menyebabkan perbedaan permeabilitas dan karakteristiknya sehingga mempengaruhi ketahanannya terhadap garam empedu (Susanti dkk., 2007). Beberapa jenis bakteri asam laktat memiliki enzim dengan aktivitas untuk menghidrolisa garam empedu (*bile salt hydrolase*, BSH). Enzim ini mampu mengubah kemampuan fisika-kimia yang dimiliki oleh garam empedu, sehingga tidak bersifat racun bagi bakteri asam laktat. Semakin tinggi konsentrasi garam empedu, maka jumlah sel bakteri asam laktat yang mati juga akan meningkat (Kusumawati, 2002).

Berdasarkan hasil pengujian ketahanan terhadap garam empedu menunjukkan bahwa Isolat AKa dan BBa (diduga *L. Acidophilus*) dan Isolat ABb, BKb dan CKa (diduga *L. Plantarum*) yang diisolasi dari jejunum kelinci berpotensi sebagai kandidat probiotik karena mampu tumbuh pada garam empedu. Adanya toleransi terhadap garam empedu diduga disebabkan oleh peranan polisakarida sebagai salah satu komponen penyusun dinding sel bakteri Gram positif (Astuti dan Rahmawati, 2010).

Lactobacillus sp. adalah mikroflora normal yang terdapat di dalam saluran pencernaan dan memiliki ketahanan yang bervariasi terhadap garam empedu. Bakteri *Lactobacillus* yang bersifat resisten terhadap garam empedu terdapat pada bagian atas usus halus (jejunum). Hal ini juga dilaporkan oleh Ray (1996) dan Drouault *et al.* (1999), bahwa jumlah bakteri asam laktat yang terdapat pada jejunum lebih rendah dibanding ileum, sekum dan kolon, disebabkan konsentrasi garam empedu pada bagian jejunum paling tinggi dan lokasinya paling dekat bila garam empedu masuk ke dalam saluran usus.

Isolat bakteri *L. Acidophilus* memiliki ketahanan lebih tinggi daripada isolat bakteri *L. Plantarum*. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Sunaryo (2011) yang menyatakan bahwa *L. Acidophilus* memiliki ketahanan yang lebih baik dibandingkan bakteri *L. Plantarum* ketika diberi perlakuan garam empedu. *Lactobacillus acidophilus* adalah bakteri yang dominan terdapat pada bagian atas saluran pencernaan. Bakteri ini membantu mengurangi tingkat bakteri berbahaya di dalam usus halus (Tamime, 2005).

Berdasarkan semua uji karakterisasi yang meliputi uji morfologi, fisiologi, biokimia, tahan asam dan garam empedu, bakteri asam laktat yang diisolasi dari jejunum kelinci merupakan bakteri *Lactobacillus sp.* dan

memiliki potensi sebagai kandidat probiotik. Bakteri yang paling banyak digunakan sebagai probiotik adalah bakteri dari golongan *Lactobacillus* karena golongan bakteri ini memiliki hampir semua karakteristik yang diperlukan suatu bakteri untuk digunakan sebagai probiotik (Wahyudi dan Samsundari, 2008).



BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini adalah:

1. Terdapat bakteri asam laktat pada hasil isolasi dari jejunum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) dengan rerata jumlah bakteri sampel kerokan sebesar $4,88 \pm 2,95 \times 10^4$ cfu/ml dan rerata jumlah bakteri sampel bilasan sebesar $2,81 \pm 1,37 \times 10^4$ cfu/ml.
2. Bakteri asam laktat hasil isolasi dari jejunum kelinci memiliki potensi sebagai kandidat probiotik berdasarkan ketahanan terhadap asam (pH 2) dan garam empedu (0,3%).

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi bakteri asam laktat hingga level spesies berdasarkan analisis molekuler.
2. Perlu dilakukan eksplorasi bakteri asam laktat dari organ pencernaan lain pada kelinci sebagai kandidat probiotik.

DAFTAR PUSTAKA

- Amelia, Hana, Puspa W. 2012. Gelombang Peristaltik Normal In Vitro pada Usus Halus Kelinci Lokal. *Jurnal Sain Veteriner*, 30 (1).
- Amy, E. H. M.Sc. 2008. *Enteric Disease in Rabbits*. Nutrifax. Shur-Gain, Nutreco Canada Inc.
- Anastiawan. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Probiotik yang Berasal dari Usus Itik Pedaging *Anas Domesticus* [Skripsi]. Fakultas MIPA, Universitas Hasanuddin. Makasar.
- Arief, I., B. Sri Laksmi J., M. Astawan, A. B. Witarto. 2010. Efektivitas Probiotik *Lactobacillus plantarum* 2C12 dan *Lactobacillus acidophilus* 2B4 Sebagai Pencegah Diare pada Tikus Percobaan. *Journal of Animal Science and Technology*, 33(3):137.
- Astuti, dan A. Rahmawati. 2010. Asimilasi Kolesterol dan Dekonjugasi Garam Empedu oleh Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Limbah Kotoran Ayam Secara In Vitro. Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA. Jurusan Pendidikan Pendidikan Biologi FMIPA UNY.
- Barrow, G. I., and R. K. A. Feltham. 1993. *Cowan, S. T. and Steel: Manual for the Identification of Medical Bacteria. Second Edition*. Cambridge University. Cambridge.
- Benson, H. J. 2002. *Microbiology Applications Laboratory Manual in General Microbiological*. Mc. Graw Hill Companies, New York.
- Bhardwaj, A., Monica, P., Sangu, K.P.S., Sanjay, K., and Tejpal, D. (2012). Isolation and Biochemical Characterization of *Lactobacillus* species Isolated from Dahi. *Research and Reviews: A Journal of Dairy Science and Technology*. 1(2): 1-14.
- Carlos, D. B., and Julian W. 2010. *Nutrition of the Rabbit 2nd Edition*. CAB International. Nosworthy Way, Wallingford. UK.
- Carol, A., V. Reene., and L.M.T. Dicks. 2011. Horizontal Gene Transfer Amongst Probiotic Lactic Acid Bacteria and Other Intestinal Microbiota: What Are The Possibilities?. *Arch Microbiol*. 193:157-168
- Collado, M. C., E. Isolauri, S. Salmien and Y. Sanz. 2009. The Impact of Probiotic on Gut Health. *Current Drug Metabolism*. 10 (1): 68-78.
- Combes, S., Fortun-Lamothe L., Cauquil L., and Gidenne. 2012. Controlling the Rabbit Digestive Ecosystem to Improve Digestive Health and Efficacy. Proceedings 10th World Rabbit Congress. Sharm El Sheikh, Egypt. 475-494.



- Delaney, C. A. J. 2006. *Anatomy and Physiology of the Rabbit and Rodent Gastrointestinal System*. Association of Avian Veterinarians
- Dibner, J.J. and J.D. Richards. 2005. Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action. *Poul Sci*, 84: 634–643.
- Djide, M. N., dan Wahyudin E. 2008. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Air Susu Ibu, dan Potensinya dalam Menurunkan Kadar Kolesterol secara In Vitro. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. Vol. 12(3).
- Drouault S, G Corthier, SD Erlich dan P Renault. 1999. Survival physiology and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:4881-4886.
- Dwijoseputro, D. 2005. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Djambatan Jakarta. Cetakan: 17. Halaman 39-51.
- Ernawati. 2008. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Susu Kambing Segar [Skripsi]. UIN Malang, Malang
- Esther van P. 2017. *Escherichia coli and The Protective role of Lactobacillus casei in newborn rabbits*. Medirabbit. Geneva, Switzerland.
- FAO/ WHO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Canada (CN) : London Ontario.
- Farida, E. 2006. Seleksi pengujian bakteri asam laktat kandidat probiotik hasil isolat lokal serta kemampuannya dalam menghambat sekresi interleukin-8 dari alur sel HCT 116 [Thesis]. Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Fathin, H. 2015. *Seleksi Bakteri Asam Laktat Sebagai Kandidat Probiotik Ayam* [Thesis]. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Felsenstein, J. 2004. *Inferring Phylogenies*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Ghafur, M. A. 2009. Nilai Kecernaan In Vivo Ransum Kelinci *New Zealand White* Jantan yang menggunakan Bagasse Fermentasi [Skripsi]. Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret. Semarang.
- Harkness and Wagners. 2011. *Biology and Medicine of Rabbits and Rodents*, 5th ed. Blackwell Publishing. Singapura.
- Heni, D. K. 2012. Seleksi, Karakterisasi dan Identifikasi Isolat Bakteri Termofilik Pasca Erupsi Merapi Sebagai Penghasil Enzim Protease [Skripsi]. FMIPA, Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta
- Herman, R. 2000. *Produksi Kelinci dan Marnot: Anatomi dan Fisiologi alat Pencernaan serta Kebutuhan Pakan*. Edisi ke-3. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Holt, J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., and William S. T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott William and Wilkins, New York.
- Hustamin, R., 2006. *Panduan Pemeliharaan Kelinci Hias*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Irlbeck, N. A. 2007. How to Feed the Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) Gastrointestinal Tract. *J. Anim. Sci.* 79: 343-346.
- Jay, J. M., M. J. Loessner, dan D. A. Golden. 2005. *Modern Food Microbiology*. 7th ed. Springer, New York.
- Khem, S., Small, D.M., and May, B.K. 2015. Understanding the stabilisation of *Lactobacillus plantarum* by drying [Tesis]. School of Applied Sciences College of Science Engineering and Health. RMIT University.
- Klaenhammer T. R., R. Barrangou, B. L. Buck, M. A. Azcarate-Peril, and E. Altermann. 2005. Genomic Features of Lactic Acid Bacteria Effecting Bioprocessing and Health. *FEMS Microbiology*. Rev. 29: 393-409.
- Kritas, S. K. and R. B. Morrison. 2005. Evaluation of Probiotics as a Substitute for Antibiotics in a Large Pig Nursery. *Veterinary Record*. 2;156(14):447-448.
- Kusumawati, N. 2002. Seleksi bakteri asam laktat indigenus sebagai galur probiotik dengan kemampuan mempertahankan keseimbangan mikroflora usus feses dan mereduksi kolesterol serum darah tikus [Tesis]. Institut Pertanian Bogor: Program Studi Ilmu Pangan.
- Lee, K. W., Park J. Y., Sa H. D., Jeong J. H., Jin D. E., Heo H. J., and Kim J. H.. 2014. Probiotic properties of *Pediococcus* strains isolated from jeotgals, salted and fermented Korean seafood. *Anaerobe*. 28:199-206.doi:10.1016.
- Lynne, V. M. 2009. Normal Flora: Diversity and Functions, *Microbial Ecology in Health and Disease*, Taylor & Francis, USA. 12:4, 193-207.
- Maghfiroh, F. 2010. *Klasifikasi Bakteri Secara Numerik Berdasarkan Fenotip* [Skripsi]. Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya. Malang.
- Maridha, N. 2012. Studi Keragaman Genetik BAL Indigenous Indonesia yg Resistan Terhadap Chloramphenicol dan Erythromycin [Skripsi]. Fakultas MIPA, Universitas Indonesia. Depok.
- Masanto, T., dan Agus A. 2011. *Beternak Kelinci Potong*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- McNitt, J. I., Patton N. M., Lukefahr S. D., and Cheeke P. R. 2013. *Rabbit Production*. 9th ed.CABI. London, UK.
- Nguyen, T. D. T. Et al., 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects.

International Journal of Food Microbiology. volume 113, Issue 3. 358-361.

- Novirisandi, R. 2012. Kajian Viabilitas dan Pola Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* pada Variasi Konsentrasi Molase dan Waktu Inkubasi [Skripsi]. Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. Surabaya.
- O'Hara, A. M. and F. Shanahan. 2006. The Gut Flora as a Forgotten Organ. *European Molecular Biology Organization Reports* 7(7):688-693.
- Ouwehand, A. C., Salminen S., and Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology*. 82(1-4):279-89.
- Pato, U. 2012. Probiotik: Prospek dan Implementasi dalam Bidang Makanan Fungsional dan Kesehatan. Universitas Riau, Riau.
- Pelczar, M. J., dan Chan E. C. S. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jilid ke-1. Hadioetomo R. S., Imas T., Tjitrosomo S. S., Angka S. L., penerjemah. Jakarta: UI Press. Terjemahan dari: *Elements of Microbiology*.
- Philip, D. M., and M. J. Hill. 2000. *Human Microbial Ecology*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Prado, F. C., J. L. Parada, A. Pandey, and C. R. Soccol. 2008. Trends in Non-dairy Probiotic Beverages. *Food Res. Int.* 41: 111-123.
- Ray B. 1996. Probiotic of lactic acid bacteria. Science or Myth. Di dalam: NATO ASI Series, editor. Lactic acid bacteria. *Current advances in metabolism, genetic and application*. Volume V(98).
- Ray, B. dan Bhunia, A.K. 2008. *Fundamental Food Microbiology*. 4th edition. Boca Raton: CRC.
- Reddy G., M. Altaf, B. J. Naveena, M. Venkateshwar, and E. V. Kumar. 2008. Amylolytic Bacterial Lactic Acid Fermentation – A Review. *J Elsevier Biotechnology Adv* 26: 22-34.
- Rohimah. 2012. Kecernaan Nutrien pada Kelinci Peranakan *New Zealand White* Jantan yang Diberi Pellet Ransum Komplit Mengandung *Indigofera zollingeriana* dan *Leucaena leucocephala* [Skripsi]. Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Ron, R. D., and Jennifer A. E. 2008. *Rabbit Gastrointestinal Physiology*, The Veterinary Clinics Exotic Animal Practice 6. Elsevier Science. USA.
- Savadago, A., C. Ouattara., I. Bassol and S. Traore. 2006. Review Bacteriocins and lactic acid bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 5 (9): 678-683.
- Soeharsono, Lovita A., Ratu S., Ofsar S., Sirajuddin A., Rita R., Hendronoto A. W., dan Andi M. 2010. *Probiotik*. Widya Padjajaran. Bandung

- Soeharsono. 2010. *Fisiologi Ternak*. Widya Padjadjaran., Bandung.
- Sopandi, T., dan Wardah. 2014. *Mikrobiologi Pangan (Teori dan Praktik)*. Andi Offset. Halaman 110; 211; 214-224; 269-272.
- Sri, S. D., dan Herlisa A. 2012. Viabilitas Bakteri Asam Laktat Asal Asi Terhadap pH Asam Lambung dan Garam Empedu [Tesis]. Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang.
- Suardana, I. W., I. N. Suarsana., I. N. Sujaya dan K. G. Wiryawan. 2007. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Cairan Rumen Sapi Bali Sebagai Kandidat Biopreservatif. *Jurnal Veteriner*. Vol. 8 No. 4 :155-159.
- Suharjo. 2008. Keanekaragaman dan Potensi Pseudomonas Strain Indigenous Pendegradasi Surfaktan Anionik di Ekosistem Sungai Tercemar Deterjen [Skripsi]. Fakultas Biologi, UGM. Yogyakarta. Disertasi
- Sujaya, I. N., Y. Ramona, N. P. Widarini, N. P. Suariani, N. M. U. Dwipayanti, K. A. Nocianitri dan N.W. Nursini. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Susu Kuda Sumbawa. *J. Vet*, 9 (2) : 52-59.
- Sunaryo, D. 2011. Karakteristik Ketahanan Bakteri Asam Laktat Indigenous Dadih Sebagai Kandidat Probiotik pada Kondisi Saluran Pencernaan In Vitro [Skripsi]. Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Susanti, I., Retno W. K., dan Fatim I. 2007. Uji Sifat Probiotik Bakteri Asam Laktat Sebagai Kandidat Bahan Pangan Fungsional. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* Vol. XVIII No. 2.
- Susilorini, T. E., Manik E. S., dan Muharli. 2008. *Budidaya 22 Ternak Potensial*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Tamime, A. Y. 2005. *Probiotic Dairy Products*. Blackwell Publishing, UK
- Timmerman, H. M., L. Mulder, H. Everts, D. C. van Espen, E. van der Wal, G. Klaassen, S. M. Rouwers, R. Hartemink, F. M. Rombouts and A. C. Beynen. 2005. Health and Growth of Veal Calves Fed Milk Replacers With or Without Probiotics. *J. Dairy Sci.* 88(6):2154-2165.
- Triana, E., dan N. Nurhidayat. 2007. *Seleksi dan Identifikasi Lactobacillus Kandidat Probiotik Penurun Kolesterol Berdasarkan Analisis Sekuen 16s RNA*. Biota, 12 (55-60).
- Velez, M. P. 2007. Identification and Characterization of Starter Lactic Acid Bacteria and Probiotics from Columbian Dairy Products. *Journal of Applied Microbiology*; ISSN; 1364-5072.
- Wahyudi, A. dan S. Samsundari. 2008. *Bugar dengan Susu Fermentasi*. Universitas Muhammadiyah Malang Press, Malang.

- Waluyo, L. 2008. *Teknik dan Metode Dasar Dalam Mikrobiologi*. UMM Press. Malang
- Weichselbaum, E. 2009. Probiotics and Health: a Review of the Evidence. *Nutrition Bulletin*. 34:340–37.
- Wijayanti, N. W. 2017. Uji Biologis Pelet yang Mengandung Limbah Kubis Terfermentasi Terhadap Profil Darah Kelinci *New Zealand White* Periode Pertumbuhan [Skripsi]. Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro. Semarang.
- Xiaodong, P. F., Tianxing C., Honggang W., and Zhanyu Z. T. 2009. The Acid, Bile Tolerance and Antimicrobial Property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*, 20, pp 598-602
- Yin, Q., and Q. Zheng. 2005. Isolation and Identification of the Dominant *Lactobacillus* in Gut and Faeces of Pigs Using Carbohydrate Fermentation and 16S rDNA Analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 99(1): 68-71.

