

**DETEKSI MOLEKULER *Lactobacillus* spp. PADA MENCIT DIARE
PASCA PEMBERIAN SINBIOTIK DENGAN MENGGUNAKAN
GEN 16S rRNA**

SKRIPSI

**OLEH
ARINA KHUSNAH
NIM. 14620021**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

**DETEKSI MOLEKULER *Lactobacillus* spp. PADA MENCIT DIARE
PASCA PEMBERIAN SINBIOTIK DENGAN MENGGUNAKAN
GEN 16S rRNA**

SKRIPSI

Oleh:
ARINA KHUSNAH
NIM.14620021

diajukan Kepada :
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019

**DETEKSI MOLEKULER *Lactobacillus* spp. PADA MENCIT DIARE
PASCA PEMBERIAN SINBIOTIK DENGAN MENGGUNAKAN GEN 16S
rRNA**

SKRIPSI

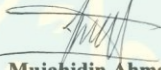
Oleh:
ARINA KHUSNAH
NIM.14620021

telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
tanggal : 14 Juni 2019

Pembimbing I


Nur Kusmiyati, M.Si
NIDT.19890816 20160801 2061

Pembimbing II


Mujahidin Ahmad, M.Sc
NIDT.19860512 20160801 1 060


Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Romaidi, M.Si, D.Sc
NIP.19810201 200901 1 019

**DETEKSI MOLEKULER *Lactobacillus* spp. PADA MENCIT DIARE
PASCA PEMBERIAN SINBIOTIK DENGAN MENGGUNAKAN GEN 16S
rRNA**

SKRIPSI

Oleh:
ARINA KHUSNAH
NIM. 14620021

telah dipertahankan
di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai
salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal : 14 Juni 2019

Penguji Utama	: Dr. drh. Hj. Bayyinatul M., M.Si (.....) NIP. 19710919 200003 2 001	
Ketua Penguji	: Prilya Dewi Fitriyari, M.Sc (.....) NIDT. 1990428 20160801 2 062	
Sekretaris	Nur Kusmiyati, M.Si (.....)	
Penguji:	NIDT. 19890816 20160801 2 061	
Anggota	Mujahidin Ahmad, M.Sc (.....)	
Penguji:	NIDT. 19860512 20160801 1 060	

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Biologi

Romaidi M.Si, D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

HALAMAN PERSEMBAHAN

Segala puji syukur atas keagungan nikmat dan karunia Allah SWT., sehingga saya mampu menyelesaikan skripsi ini. Karya ini akan dipersembahkan kepada orang-orang yang telah berjasa hingga saya dapat menyelesaikan skripsi dan mendapatkan gelar sarjana. Semoga Allah membalas segala kebaikan dan pengorbanan kalian.

Terimakasih tak terhingga kepada kedua orang tua dan saudara-saudara saya atas segala bentuk pendidikan, pengajaran, doa dan dukungan baik secara moral maupun materi yang telah diberikan sehingga dapat mengantarkan saya sampai tahap ini.

Ibu Nur Kusmiyati, M.Si dan bapak Mujahidin Ahmad, M.Sc selaku dosen pembimbing skripsi saya ucapkan terima kasih atas bimbingan dan arahnya hingga saya bisa menyelesaikan skripsi ini. Tidak lupa juga kepada seluruh dosen dan civitas akademik Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang atas semua bimbingan, fasilitas serta layanan yang diberikan sehingga mempermudah menyelesaikan tahap ini.

Terimakasih kepada sahabat terbaik saya, Dwi Riski Kurniawati dan Isna Rezqia, teman-teman tim mikrobiologi dan molekuler (Yoda, Eva, Hari, Rifki, Nisa, Haris, Dita, Eli, Affan dan Rasya), keluarga MSAA UIN Maulana Malik Ibrahim Malang khususnya ABA 56, sahabat-sahabat telomer 2014 dan teman-teman jurusan biologi lainnya. Maaf jika selalu merepotkan dan terimakasih telah ikhlas membantu dalam penyelesaian skripsi ini. Terimakasih pengalaman, ilmu dan kisah juga semangat yang akan menjadi kenangan yang tak terlupakan.

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Arina Khusnah

NIM : 14620021

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Skripsi : Deteksi Molekuler *Lactobacillus* spp. pada Mencit Diare
Pasca Pemberian Sinbiotik Menggunakan 16S rRNA

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya siap menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 14 Juni 2019

Yang membuat pernyataan



Arina Khusnah

NIM. 14620021

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



Deteksi Molekuler *Lactobacillus* spp. pada Mencit Diare Pasca Pemberian Sinbiotik Menggunakan 16S rRNA

Arina Khusnah, Nur Kusmiyati, Mujahidin Ahmad

ABSTRAK

Diare merupakan pengeluaran feses lebih dari 3 kali per hari dalam kondisi encer yang dapat atau tanpa disertai lendir dan darah. Diare dapat disebabkan oleh bakteri patogen *Escherichia coli* Enteropatogenik (EPEC). Bakteri patogen yang menginfeksi saluran pencernaan dapat diatasi dengan pemberian sinbiotik bakteri *Lactobacillus casei* AP dan inulin umbi dahlia. *Lactobacillus* dapat melakukan kolonisasi pada mukosa usus sehingga bakteri patogen tidak dapat melekatkan diri pada sel epitel usus. Penelitian secara genotip mengenai keberadaan *Lactobacillus* pada usus besar yang terinfeksi bakteri EPEC perlu dilakukan dikarenakan identifikasi secara fenotip memiliki beberapa kelemahan diantaranya hasil yang tidak konsisten dan waktu yang relatif lama sehingga terjadi ketidaktepatan dalam mengidentifikasi spesies. Salah satu identifikasi bakteri *Lactobacillus* berdasarkan sifat genotip yaitu dengan menggunakan sekuen 16S rRNA. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui *Lactobacillus* spp. yang terdeteksi pada mencit diare pasca pemberian sinbiotik dengan menggunakan 16S rRNA. Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif eksploratif kualitatif. Identifikasi secara genotip dilakukan dengan beberapa tahap, yaitu pembuatan kultur bakteri, isolasi DNA bakteri genom, sekuensing gen 16S rRNA. Isolasi DNA menggunakan metode NaCl dan hasil sekuensing dilakukan pengecekan di *sequen scanner*. Hasil dari *sequen scanner*, sekuennya dibandingkan dengan database 16S rRNA dengan menggunakan BLAST online software. Berdasarkan analisa genetika diketahui bahwa isolat L-1 memiliki kemiripan dengan *Lactobacillus casei* strain NWAUFU1554 (97%).

Kata kunci: *Lactobacillus* spp., Diare, Sinbiotik, Gen 16S rRNA

Molecular Detection of *Lactobacillus* spp. in Diarrhea Mice After Giving Synbiotic Using 16S rRNA

Arina Khusnah, Nur Kusmiyati, Mujahidin Ahmad

ABSTRACT

Diarrhea is fecal excretion that is more than 3 times per day in runny conditions that can or without mucus and blood. Diarrhea is caused by pathogenic bacterium *Escherichia coli* Enteropathogenic (EPEC). It is because the infection of pathogenic bacteria in the digestive tract with synbiotic administration of *Lactobacillus casei* AP bacteria and inulin from dahlia tuber. *Lactobacillus* can colonize the intestinal mucosa. This causes pathogenic bacteria cannot attach themselves to intestinal epithelial cells. Genotypic research on the presence of *Lactobacillus* in the large intestine infected with EPEC bacteria needs to be carried out because the phenotypic identification has several weaknesses. The weaknesses are inconsistent results and relatively long time so that there is an inaccuracy in identifying species. One of the ways to identify *Lactobacillus* bacteria based on genotypic properties is by using 16S rRNA sequences. The aim of this research is to determine *Lactobacillus* spp which is detected in diarrhea mice after synbiotic administration using 16S rRNA. However, The type of this research is qualitative descriptive exploratory. Besides, genotypic identification is carried out in several stages. The stages are making the bacterial cultures, isolating the bacterial genome DNA, and sequencing the 16S rRNA gene. DNA isolation using the NaCl method and the results of sequencing are checked in the sequel scanner. As a result of the scanner sequences, the sequence is compared with the 16S rRNA database using online BLAST software. Based on genetic analysis, it is estimated that L-1 isolates are similar to *Lactobacillus casei* strain NWAUFU1554 (97%).

Keywords: *Lactobacillus* spp., Diarrhea, Synbiotic, 16S rRNA gene

كشف الجزيئي الملينة (SPP) في (Mencit Diare) بعد إعطاء التكافلية يستخدم (S rRNA16) أرينا حسنة، نور حسمية، مجاهدين أحمد.

مستخلص البحث

الإسهال هو إخراج البراز كثير من ثلاثة مرات في الأيام في الحال المائي الذي يكون أو بدون سال لعبه والدام. يستطيع الإسهال يُسبب من البكتيريا المسببة للأمراض (*Escherichia coli*) (Enteropatogenik (EPEC). إصابة البكتيريا المسببة للأمراض في الجهاز الهضمي بإعطاء التكافلية البكتيريا (*Lactobacillus casei* AP) وأنولين الداليا الدرنية. تستطيع الملينة ان تفعل الإستعمار في الغشاء المخاطي المعوي حتى لا يستطيع البكتيريا المسببة للأمراض ان يلصق نفسه إلى الخلايا الطلائية المعوية. البحث النمط الجيني عن موجود الملينة في أمعاء الغليظة إلتهاب البكتيريا (EPEC) يحتاج ان يفعل لأن التعارف النمط الظاهري يملك الضعفاء، مثل الحاصل الذي لا ينسجم والوقت الطويل حتى يحدث ان لا يناسب في التعرف النوع. واحد من التعرف البكتيريا الملينة بناء على الصفة النمط الجيني هي باستخدام متو اليات (S rRNA16). الهدف من هذا البحث لتعريف الملينة (spp) الإكتشاف في (mencit diare) بعد إعطاء التكافلية يستخدم (S rRNA16). وجنس من هذا البحث هو الوصفي الإستطلاعي النوعي. التعرف بالنمط الجيني يُفعل بالمراحل، هي إجمال الثقافة البكتيرية، العزل (DNA) البكتيريا الجينوم، تسلسل الجينات (S rRNA16). يستخدم العزل (DNA) الطريقة (NaCl) وحاصل تسلسل الجينات يُفعل التبيين في (sequen scanner). وحاصل من (sequen scanner) هو متو الياته يُوازن بقاعدة بيانات (S rRNA16) باستخدام (BLAST online software). بناء على التحليل الجيني يعرف أن عزلة (L-1) تملك التشبيه بالملينة (caseistrain NWAUFU1554 (97%).

الكلمات المفتاحات: الملينة (SPP)، (Diare)، التكافلية، جينة (S rRNA16).

MOTTO

وَعَسَى أَنْ تَكْرَهُوا شَيْئًا وَهُوَ خَيْرٌ لَكُمْ وَعَسَى أَنْ تُحِبُّوا شَيْئًا وَهُوَ شَرٌّ لَكُمْ وَاللَّهُ يَعْلَمُ وَأَنْتُمْ لَا تَعْلَمُونَ

Boleh jadi kamu tidak menyenangi sesuatu, padahal itu baik bagimu, dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu tidak baik bagimu



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah yang telah dilimpahkan-Nya sehingga skripsi dengan judul “Deteksi Molekuler *Lactobacillus* spp. pada mencit diare pasca pemberian sinbiotik menggunakan 16S rRNA” ini dapat diselesaikan dengan baik. Shalawat serta salam semoga tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing manusia ke jalan yang benar.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, motivasi, dan dukungan dari berbagai pihak. Ucapan terima kasih dengan mengharapkan keridhoan penulis sampaikan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Romaidi, M.Si., D.Sc selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Nur Kusmiyati, M.Si dan Mujahidin Ahmad, M.Si selaku Dosen Pembimbing skripsi telah banyak meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan dengan penuh kesabaran. Semoga ilmu yang telah diberikan beliau berdua menjadi amal jariyah.
5. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Mukarromah, M.Si dan Prilya Dewi Fitriasari, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran sehingga tugas akhir ini dapat terselesaikan dengan baik.
6. Dr. Hj. Ulfa Utami M.Si selaku Dosen Wali yang telah memberikan dukungan dan semangat sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan
7. Seluruh dosen, laboran dan staff Administrasi jurusan biologi yang telah membantu dan memberikan kemudahan
8. Kedua orang tua dan saudara juga keluarga besar saya yang selalu memberikan semangat dan motivasi kepada penulis hingga dapat meraih cita-citanya. Semoga Allah memberi keridhoan kepada keluarga penulis

9. Sahabat terbaik saya Dwi Riski Kurniawati dan Isna Rezqia, dua sahabat yang selalu ada dalam suka dan duka, saling mendukung, mendoakan dan menemani dalam keadaan apapun. Semoga persahabatan ini dapat menuju surgaNya dan urusan kalian dipermudah olehNya
10. Harits Amrullah dan Khairunnisa Dwi Lestari teman dalam satu bimbingan skripsi yang selama ini berjuang bersama dalam mengerjakan skripsi ini
11. Keluarga besar MSAA UIN Malang khususnya teman-teman ABA 49 yang telah mendukung dan mendoakan penulis selama masa belajar di UIN Malang
12. Keluarga besar Biologi 14 UIN Malang (Telomer) khususnya mikrobiologi dan molekular team (Eva, Affan, Ely, Ayu, Inna, Yoda, Dita, Rasya dan Hari) yang telah memberikan dukungan dan motivasi serta pengalaman yang sangat berharga. Semoga Allah mempermudah urusan kalian
13. Dan teman-teman yang lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan semangat dan dukungan hingga skripsi ini bisa terselesaikan

Akhirnya, penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini, karena kesempurnaan hanya milik Allah SWT. Untuk itu, saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis khususnya bagi para pembaca umumnya. Aamiin yaa Rabbal alamin

Malang, 14 Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	vi
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
مستخلص البحث	x
MOTTO	xi
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.5 Batasan Masalah	6
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Diare	8
2.2 <i>Escherichia coli</i> Enteropatogenic (EPEC)	11
2.3 Produk Sinbiotik	14
2.3.1 Inulin Umbi Dahlia (<i>Dahlia pinnata</i> L)	14
2.3.1 <i>Lactobacillus casei</i> AP	15
2.4 <i>Lactobacillus</i> spp.	17
2.5 Usus Besar (Kolon)	18
2.6 Gen 16S rRNA	20

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian	25
3.2 Waktu dan Tempat	25
3.3 Objek Penelitian.....	25
3.4 Alat dan Bahan.....	25
3.4.1 Alat.....	25
3.4.2 Bahan	26
3.5 Prosedur Penelitian	26
3.5.1 Persiapan Hewan Coba	26
3.5.2 Perlakuan Hewan Coba.....	26
3.5.3 Pembuatan Kultur Bakteri.....	27
3.5.4 Isolasi DNA Bakteri Genom.....	28
3.5.5 Elektroforesis	28
3.5.6 Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnia DNA.....	29
3.5.7 PCR.....	30
3.6 Analisis Data	30

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Pemberian Sinbiotik Pada Mencit Dare Terhadap Konsistensi Feses	32
4.2 Isolat Bakteri <i>Lactobacillus</i> dari Usus Besar Mencit Diare Pasca Pemberian Sinbiotik.....	33
4.3 Deteksi <i>Lactobacillus</i> spp. pada Mencit Diare Pasca Pemberian Sinbiotik Menggunakan 16S rRNA	35

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran.....	41

DAFTAR PUSTAKA.....	42
----------------------------	-----------

LAMPIRAN.....	49
----------------------	-----------

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Data Konsistensi Feses Mencit.....	32
4.2 Jumlah Koloni <i>Lactobacillus</i> pada Media LBS Agar.....	33
4.3 Hasil Uji Kuantitatif DNA dengan <i>Nanodrop</i>	35
4.4 Hasil BLAST isolat L-1 pada Mencit Diare Pasca Pemberian Sinbiotik	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Ilustrasi Skematis Operon rRNA dari <i>Escherichia coli</i>	21
4.1 Koloni <i>Lactobacillus</i> yang Tumbuh pada Media LBS Agar	33
4.2 Visualisasi Pita DNA Hasil PCR pada Gel Agarose	36



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi Media LBS	49
2. Dokumentasi Media dan Koloni.....	50
3. Sekuen <i>Lactobacillus casei</i> Strain NWAUFU1554 dan Sekuen Isolat L-1	52
4. Hasil BLAST.....	54



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kematian pada anak balita di dunia sebanyak 70% disebabkan oleh diare yang setiap tahunnya tercatat 1.8 milyar meninggal (Kemenkes, 2012; Humrah, 2018). Diare merupakan pengeluaran feses lebih dari 3 kali per hari dalam kondisi encer yang dapat atau tanpa disertai lendir dan darah (Simadibrata, 2006). Penyakit diare dapat disebabkan oleh virus dan bakteri. Bakteri *Escherichia coli enteropatogenic* (EPEC) menduduki peringkat kedua penyebab diare setelah rotavirus (Anggreli, 2015). Menurut Muttaqin (2016), mekanisme bakteri EPEC menyebabkan diare dengan menempel dan mengakibatkan luka sel epitelium dinding usus sehingga terjadi peradangan dan kehilangan cairan pada dinding usus. Penempelan bakteri EPEC pada dinding usus menyebabkan kolonisasi bakteri patogen pada saluran cerna sehingga terjadi kompetisi antara bakteri patogen dan mikroflora normal pada usus. Diare dapat menyebabkan kehilangan cairan hal ini karena adanya gangguan pada transport air dan keseimbangan elektrolit akibat penurunan absorpsi dari lumen usus (Thapar, *et al.*, 2004).

Adanya bakteri EPEC sebagai penyebab diare ini secara implisit berkaitan dengan firman Allah dalam surat Al Baqarah ayat 26-27:

﴿إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا فَأَمَّا الَّذِينَ ءَامَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ ؕ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ ۝﴾

Artinya:

Sesungguhnya Allah tiada segan **membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu**. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: "Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?". Dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik (Al Baqarah:26).

Kata “maa” untuk ayat ini menunjukkan sesuatu yang kecil atau sedikit. Sedangkan kata “ba’uudlatan” dalam ayat ini berkedudukan sebagai badal (pengganti). Sebagaimana jika mengatakan: la adlribanna dlarban maa (aku akan memberikan perumpamaan apa pun), yang berarti sekecil apa saja (Ibn Katsir, 2003).

Makhluk hidup yang memiliki ukuran lebih kecil dari nyamuk dalam ilmu pengetahuan biologi salah satunya yaitu bakteri. Bakteri memiliki ukuran yang lebih kecil dari nyamuk sehingga tidak dapat dilihat dengan kasat mata. Artinya, bahwa benar Allah telah menciptakan makhluk hidup berupa bakteri yang memiliki ukuran yang mikro. Ayat tersebut juga menjelaskan bahwa Allah memerintahkan pada hambaNya untuk bertafakkur alam bahkan sampai pada makhluk hidup-Nya yang berukuran mikro.

Allah berfirman dalam surat Yunus ayat 101 sebagai berikut:

قُلْ أَنْظَرُوا مَاذَا فِي السَّمُوتِ وَالْأَرْضِ^ج وَمَا تُغْنِي الْآيَاتُ وَالنُّذُرُ عَنْ قَوْمٍ لَّا يُؤْمِنُونَ^{١١}

Artinya:

Katakanlah: **“Perhatikanlah apa yaag ada di langit dan di bumi**. Tidaklah bermanfaat tanda kekuasaan Allah dan rasul-rasul yang memberi peringatan bagi orang-orang yang tidak beriman“ (Yunus:101).

Ayat ini secara implisit memerintahkan untuk memperhatikan apa-apa yang ada di alam semesta agar menjadi peduli dengan lingkungan sehingga dapat menambah keimanan atas nikmat dan keMaha Besaran Allah SWT. Dalam tafsir jalalain pada ayat ini dijelaskan bahwa terdapat seruan untuk mencermati dan merenungi alam semesta ini sebagai bukti keagungan dan ke-Maha Esaan Allah sehingga dapat menjadikan seseorang untuk beriman. Ayat ini juga mengajak manusia untuk terus mengembangkan ilmu pengetahuan melalui eksperimentasi dan pengamatan dalam menggali pengetahuan mengenai alam dan isinya. Hal ini seperti memperhatikan kasus diare yang sering terjadi pada bayi dengan melihat penyebab juga pengobatan yang dapat dilakukan.

Bakteri patogen yang menginfeksi pada saluran pencernaan dapat diatasi dengan pemberian sinbiotik. Menurut Scherezenmeir & Vrese (2001), sinbiotik merupakan kombinasi seimbang probiotik dan prebiotik dalam mendukung pertumbuhan bakteri yang menguntungkan dalam saluran pencernaan. Pada penelitian ini, bakteri yang digunakan sebagai probiotik adalah bakteri *Lactobacillus casei* AP. Hal ini sesuai dengan penjelasan Widodo *et al.*, (2012) bahwa *Lactobacillus casei* AP bersifat probiotik. Prebiotik alami yang digunakan pada penelitian ini menggunakan inulin umbi dahlia. Hal ini sesuai dengan penjelasan Kusmiyati (2018) bahwa ekstrak inulin umbi dahlia dapat digunakan sebagai prebiotik untuk mendukung pertumbuhan bakteri probiotik *L. casei* AP.

Proses penambahan mikroorganisme probiotik dengan prebiotik disebut dengan sinbiotik. Produk sinbiotik dapat meningkatkan konsentrasi asam laktat dan asam asetat, keberadaan asam laktat dan *short chain fatty acid* (SCFA)

mampu meningkatkan penyerapan kalsium pada usus besar (Donkor, 2007; Herminiati, 2015). Efek yang ditimbulkan dari penambahan *Lactobacillus* dan inulin umbi dahlia pada kasus diare salah satunya dapat ditandai dengan adanya konsistensi feses. Hal ini seperti yang dijelaskan oleh Yonata (2016) bahwa bakteri probiotik dapat membantu proses absorpsi nutrisi dan menjaga gangguan dalam penyerapan air yang akan berpengaruh pada perbaikan konsistensi feses. Menurut Widodo (2017), usus besar merupakan bagian saluran pencernaan yang banyak terjadi kolonisasi mikrobiota. Mikrobia yang berada di usus besar proksimal (bagian kanan) memiliki banyak suplai nutrisi makanan sehingga tumbuh lebih cepat dan dapat menurunkan pH akibat adanya produksi asam lemak rantai pendek (*short chain fatty acid*);SCFA.

Keberadaan bakteri *Lactobacillus* sebagai probiotik pada kolon sangat penting dipertahankan karena dapat berpengaruh pada efek kesehatan misalnya menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Gibson, 2004). Hal ini sesuai dengan penjelasan Wahyuningsih (2014), probiotik dari jenis *L. helveticus* Rosell-52 dan *L. rhamnosus* dapat mengaktifkan fagosit dan meningkatkan produksi makrofag baik penelitian pada manusia maupun pada tikus percobaan. Menurut Shinta (2011) dalam penelitiannya mengungkapkan bahwa probiotik dari *L. reuteri* dan *L.acidophilus*-LGG dapat menurunkan frekuensi dan durasi diare. Menurut Yonata (2016) Secara *in-vivo*, juga dibuktikan bahwa suplementasi susu dengan probiotik jenis *Lactobacillus casei* strain DN114 001, secara signifikan dapat menurunkan gejala klinis diare.

Genus *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* merupakan probiotik yang terdapat pada saluran pencernaan. Salah satu indikator kesehatan usus dapat ditandai dengan adanya kolonisasi probiotik misalnya *Lactobacillus*. Menurut Sanz (2007) di dalam lumen saluran cerna terjadi kolonisasi bakteri probiotik dengan cara menempel pada mukosa usus sehingga bakteri probiotik menempati seluruh epitel mukosa usus melalui reseptor sel epitel usus. Hal ini menyebabkan bakteri patogen tidak dapat melekatkan diri pada sel epitel usus dan akhirnya tidak terjadi kolonisasi bakteri patogen. Penelitian ini dilakukan identifikasi bakteri *Lactobacillus* pada usus besar karena menurut Sharma *et al* (2005), *Lactobacillus* merupakan mikrobial alami pada saluran pencernaan. Selain itu, pada penelitian ini probiotik yang digunakan adalah *Lactobacillus casei* AP. Menurut Otieno (2011) bahwa dari 106 spesies *Lactobacilli*, 56 diantaranya bersifat probiotik sedangkan dari 30 *Bifidobacteria*, 8 berpotensi sebagai probiotik. Hal ini menjadi dasar bahwa pemanfaatan bakteri *Lactobacilli* banyak dimanfaatkan sebagai probiotik dibanding *Bifidobacterium*.

Penelitian secara genotip mengenai keberadaan *Lactobacillus* pada usus besar yang terinfeksi bakteri EPEC perlu dilakukan dikarenakan identifikasi secara fenotip memiliki beberapa kelemahan, karakter fenotip yang dimiliki oleh bakteri dapat berubah seiring dengan perubahan kondisi bakteri dan adanya perubahan evolusi (Nurwati, 2015), hasil yang tidak konsisten dan waktu yang relatif lama (Nuraida, 2012) sehingga terjadi ketidaktepatan dalam mengidentifikasi spesies. Salah satu identifikasi bakteri *Lactobacillus* berdasarkan sifat genotip yaitu dengan menggunakan sekuen 16S rRNA.

Penggunaan sekuen 16S rRNA sebagai penanda molekuler pada penelitian ini didasarkan pada penjelasan Chakravorty *et al.* (2007) bahwa di dalam sekuen gen 16S rRNA bakteri umumnya terdapat sembilan daerah *hypervariable* yang dilambangkan dengan V1-V9. Daerah *hypervariable* ini menunjukkan urutan basa dengan perbedaan yang besar di antara spesies bakteri yang berbeda dan dapat digunakan untuk identifikasi spesies dan menentukan urutan sekuen spesies spesifik. Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian deteksi molekuler *Lactobacillus* spp. pada mencit diare pasca pemberian sinbiotik menggunakan 16S rRNA dengan menggunakan PCR dan sekuensing.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu apa saja *Lactobacillus* spp. yang terdeteksi pada mencit diare pasca pemberian sinbiotik dengan menggunakan 16S rRNA?

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah tersebut, maka tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui *Lactobacillus* spp. yang terdeteksi pada mencit diare pasca pemberian sinbiotik menggunakan 16S rRNA.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini yaitu:

- a. Manfaat teoritis pada penelitian ini yaitu menambah pengetahuan tentang keragaman bakteri *Lactobacillus* yang terdeteksi pada mencit diare pasca pemberian sinbiotik

- b. Manfaat secara praktis yaitu menambah pengetahuan mengenai produk sinbiotik dari *Lactobacillus casei* AP dan inulin umbi dahlia sebagai alternatif dalam mengatasi penyakit diare yang disebabkan oleh *Enteropatogenic Escherichia coli* (EPEC)

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini yaitu:

- a. Hewan coba yang digunakan adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) galur Balb C
- b. Isolat bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu bakteri *Enteropatogenik Escherichia coli* (EPEC) dari Laboratorim Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Univesitas Gajah Mada Yogyakarta dan *Lactobacillus casei* AP (Widodo *et al.*, 2012; Widodo *et al.*, 2014)
- c. Primer yang digunakan adalah 27F (5'AGAGTTTGATCCTGG 3') dan 1429R (3' GTTTACCTTACGACTT 5') (Purwati, 2018)
- d. Inulin yang digunakan pada penelitian ini adalah inulin umbi dahlia (Kusmiyati, 2018)

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diare

Diare adalah pengeluaran feses yang lembek sampai cair dengan frekuensi pengeluaran feses sebanyak 3 kali atau lebih dalam sehari. Diare dapat mengakibatkan gejala demam, sakit perut, penurunan berat badan, kehilangan nafsu makan dan mudah lelah. Selain itu, diare juga dapat menyebabkan dehidrasi (Subagyo, 2012; Aman, 2015). Dehidrasi yang parah akan menyebabkan kematian. Gejala ditandai dengan dehidrasi, mual, muntah, pucat, demam, keratin abdominal, mata cekung, dan membran mukosa kering (Hasan, 2007; Lolopayung, 2014).

Penyebab diare juga dapat disebabkan oleh infeksi tetapi juga disebabkan malabsorpsi seperti malabsorpsi disakarida dan monosakarida. Selain itu, dapat dikarenakan makanan basi, beracun, psikologis misalnya takut dan cemas (Vila J *et al.*, 2000). Diare dapat disebabkan oleh satu atau lebih patofologis, diantaranya: diare osmotik yang mengakibatkan tingginya osmolaritas intraluminal, diare sekeretorik yang menyebabkan tingginya sekresi cairan dan elektrolit, diare inflamatorik yang mengakibatkan adanya inflamasi pada usus, diare infeksi karena terjadi infeksi pada dinding usus, malabsorpsi asam empedu juga lemak, adanya gangguan pada permeabilitas usus, terjadi transport elektrolit aktif di enterosit, perubahan transit usus (Setiawan, 2006).

Diare yang disebabkan oleh efek enterotoksin pada infeksi *Escherichia coli* adalah diare sekeretorik. Pada diare sekeretorik terjadi peningkatan sekresi air

dan elektrolit dari usus dan menurunnya absorpsi. Diare sekterorik memiliki sifat yang khas yaitu terjadi banyaknya volume feses pada diare. Diare ini mengeluarkan feses cair yang mengandung sejumlah ion natrium, klorida dan bikarbonat. Kehilangan air dan elektrolit dapat menyebabkan dehidrasi, asidosis metabolik dan hypokalemia (Aman, 2015).

Mekanisme bakteri patogen yang masuk ke dalam tubuh dapat melalui makanan dan minuman. Hal ini sesuai dengan perintah Allah dalam surat Abasa ayat 24 sebagaimana berikut:

فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَى طَعَامِهِ ۚ

Artinya:

Maka hendaklah manusia itu **memperhatikan makanannya** (Abasa:24).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah menyuruh manusia untuk memperhatikan makanannya, bagaimana Ia telah menyiapkan makanan yang bergizi yang mengandung protein, karbohidrat, dan lain-lain sehingga memenuhi kebutuhan hidupnya. Manusia dapat merasakan lezatnya makanan dan minumannya yang juga menjadi pendorong bagi pemeliharaan tubuhnya sehingga tetap dalam keadaan sehat dan mampu menunaikan tugas yang dibebankan kepadanya (Depag RI, 1994).

Dalam surat Al-baqarah ayat 168, Allah juga menjelaskan kepada hambaNya untuk memperhatikan makanannya dalam aspek haram dan halal sebagaimana berikut:

يَا أَيُّهَا النَّاسُ كُلُوا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَالًا طَيِّبًا وَلَا تَتَّبِعُوا خُطُوَاتِ الشَّيْطَانِ
إِنَّهُ لَكُمْ عَدُوٌّ مُبِينٌ ۝ ١٦٨

Artinya:

Wahai manusia! **Makanlah dari (makanan) yang halal dan baik yang terdapat di bumi** dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah setan. Sungguh, setan itu musuh yang nyata bagimu (Al-Baqarah:168).

Ayat tersebut Allah telah menjelaskan bahwa wahai manusia, makanlah dari rezeki Allah di muka bumi yang Dia izinkan untuk kalian, yaitu yang suci bukan najis, yang bermanfaat dan tidak membahayakan. Jangan mengikuti jalan-jalan setan dalam menghalalkan dan mengharamkan, dalam berbuat berlebihan dan bermaksiat, karena setan adalah musuh kalian yang nyata (Aidh, 2007). Manusia dianjurkan untuk memperhatikan apa yang dimakannya, baik dalam masalah halal atau haram juga mengenai dampak baik atau buruk pada kesehatan tubuh. Konsumsi makanan dan minuman yang tidak melihat dari segi higienitas dapat menjadi racun bagi tubuh karena banyak mengandung bakteri patogen yang dapat membahayakan tubuh. Selain itu, mengonsumsi makanan dan minuman yang mengandung bakteri probiotik dapat memberikan efek kesehatan pada tubuh karena bakteri probiotik dapat memperbaiki mikroflora pada saluran pencernaan.

Bakteri patogen yang masuk ke sel-sel epitel usus halus dan menyebabkan infeksi yang dapat merusak sel-sel epitel. Sel-sel epitel yang mengalami kerusakan akan digantikan oleh sel-sel epitel yang belum matang sehingga fungsi selnya belum optimal. Selanjutnya, vili-vili pada usus halus mengalami kerusakan yang dapat mengakibatkan tidak terserapnya cairan dan makanan dengan baik. Cairan dan makanan yang tidak terserap akan terakumulasi di usus halus menyebabkan tekanan osmotik pada usus akan meningkat. Hal ini mengakibatkan lumen usus terdapat banyak cairan. Cairan dan makanan yang tidak diserap

tersebut akan dikeluarkan melalui anus sehingga terjadi diare (Kilegman, 2006; Utami, 2016).

Manifestasi klinis pada diare yaitu gelisah, demam, dan penurunan hawa nafsu. Tinja berupa cair dan disertai dengan lendir maupun darah. Frekuensi defekasi yang meningkat menyebabkan anus dan daerah sekitarnya menjadi luka. Selain itu, terjadi tinja yang mengandung asam. Hal ini dikarenakan banyaknya asam laktat pada tinja karena laktosa tidak dapat diabsorpsi oleh usus selama diare (Parashar 2003; Utami 2016).

2.2 Enteropatogenic *Escherichia coli* (EPEC)

Bakteri *Escherichia coli* (*E.coli*) tergolong dalam family Enterobacteriaceae dan genus *Escherichia*. Tahun 1885, Theodor Escherich merupakan orang yang pertama kali mengisolasi *E.coli*. Bakteri *E.coli* dapat ditemukan di dalam saluran pencernaan manusia maupun hewan. Bakteri ini memiliki bentuk batang, memiliki ukuran 0.4-0.7x 1.0-3.0 µm, termasuk dalam bakteri gram negatif, tidak membentuk spora, dapat hidup soliter dan berkelompok, motil, dan fakultatif anaerob (Radji, 2005).

Bakteri *E.coli* berdasarkan perbedaan serotype dibagi menjadi empat golongan yaitu: enterotoksigenik (ETEC), enteroinvasif (EIEC), enteropatogenik (EPEC), enterohemoragik (EHEC). Enterotoksin merupakan racun dari *E.coli* yang dapat menyebabkan diare. EPEC (*Enteropatogenic Escherichia coli*) dan EHEC (*Enterohemorragik Escherichia coli*) merupakan bakteri patogen yang menyebabkan terjadinya penyakit diare yang menyerang permukaan humenal epitel usus host. Selain itu ada jenis lain bakteri *E. coli* berdasarkan virulensinya

yaitu enterotoxigenic (ETEC), enteroinvasine (EIEC), enteroaggregative (EAEC) (Rohdiana, 2013).

Enteropathogenic Escherichia coli merupakan salah satu galur dari bakteri *E.coli* yang menyebabkan diare berair hingga berdarah. Bakteri EPEC merupakan bakteri yang memiliki karakteristik sebagai berikut: bakteri penyebab diare, kemampuan dalam memproduksi hispatologi pada epitel usus yang dikenal dengan lesi *attaching* dan *effacing*, dan tidak memproduksi toksin shiga. Manifestasi klinis infeksi EPEC adalah diare dengan feses encer yang mengandung mukus tetapi tidak berdarah. Gejala lainnya ditandai dengan adanya demam, lesu, muntah-muntah, dehidrasi, dan kehilangan berat badan. Diare EPEC biasanya terjadi antara 5-15 hari tetapi bisa juga menjadi diare kronis dan dapat menyebabkan kematian dengan laju mortalitas sampai 50% (Donnenberg, 2002).

Bakteri EPEC dapat menyebabkan diare pada bayi. EPEC melekat pada mukosa usus halus yang dapat menyebabkan hilangnya mikrovili (penumpulan) juga dapat masuk ke dalam mukosa. Bakteri EPEC memiliki fimbria, toksin yang tahan terhadap panas (ST) dan toksin yang tidak tahan panas (LT), serta menggunakan adhesin, yang dikenal dengan intimin, hal tersebut yang menyebabkan EPEC dapat menempel pada sel mukosa usus. Infeksi yang disebabkan oleh EPEC yaitu diare encer yang dapat sembuh sendiri namun dapat menjadi kronis. Diare yang disebabkan oleh EPEC dapat disembuhkan dengan pemberian sinbiotik (Muttaqin, 2016).

Efek patogenitas yang ditimbulkan dari bakteri EPEC hingga menyebabkan penyakit diare tidak lepas dari peran kekuasaan Allah dalam

pengaturan segala hal di alam semesta ini. Hal ini secara tersirat seperti yang dijelaskan dalam firmanNya surat Yunus ayat 61 sebagai berikut:

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْءَانٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ^{٦١}

Artinya:

Kamu tidak berada dalam suatu keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. **Tidak luput dari pengetahuan** Tuhanmu biarpun sebesar zarrah (atom) di bumi ataupun di langit. Tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, **melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata** (Lauh Mahfuzh) (Yunus:61)

Dalam ayat tersebut, Allah menjelaskan bahwa sesungguhnya Allah maha Mengetahui segalanya. Tidak ada satu urusan pun yang sedang kamu (Muhammad) hadapi, bacaan Al Quranmu, segala perbuatanmu, dan umatmu, kecuali Kami menjadi saksi dan pengawasnya pada saat kalian mengerjakannya dengan sungguh- sungguh. Tidak ada sesuatu pun yang terlepas dari pengetahuan Allah, seringan dzarrah (atom) sekalipun, baik di langit maupun di bumi, lebih ringan atau lebih berat. Semua tercatat dengan jelas dan terang di sisi Allah (Shihab, 2003). Allah memberi tahu bahwa sesungguhnya Allah mengetahui semua keadaan makhlukNya dalam setiap saat, setiap menit dan setiap detik, Dan sesungguhnya tidak luput dari pengetahuan dan penglihatanNya. Hal ini seperti pada bakteri yang memiliki sifat pathogen misalnya pada bakteri *Escherichia coli*. Sifat patogen yang dimiliki oleh bakteri *E.coli* tidak lepas dari penguasaan Allah

sehingga mengisyaratkan Allah adalah dzat yang Maha Mengetahui lagi Maha Kuasa.

2.3 Produk Sinbiotik

2.3.1 Inulin Umbi Dahlia

Prebiotik merupakan komponen bahan makanan yang tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim pencernaan dan mempunyai pengaruh menguntungkan bagi inang melalui stimulasi pertumbuhan dan aktivitas dari probiotik pada usus besar dan menghambat bakteri patogen (Gibson & Fuller, 2004). Prebiotik dapat digunakan sebagai sumber energi atau nutrient terbatas lainnya bagi mukosa usus. Prebiotik juga dimanfaatkan sebagai substrat untuk fermentasi bakteri cecal dalam menghasilkan vitamin dan antioksidan sehingga dapat menguntungkan inangnya (Haryati, 2011).

Syarat yang harus dipenuhi oleh bahan pangan agar dapat dimanfaatkan sebagai prebiotik diantaranya tahan terhadap enzim pencernaan dalam usus manusia, dapat difermentasi oleh koloni mikroflora, bifidogenik, dan dapat bertahan dalam kondisi pH rendah. Beberapa prebiotik dapat memberikan keuntungan pada spesifik mikroflora usus pencernaan seperti *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria* (Willard *et al.*, 2000) yang menyebabkan terjadinya kompetisi langsung oleh bakteri patogen dari pencernaan terhadap nutrient. Prebiotik tidak dapat dicerna oleh enzim, tetapi dapat difermentasi oleh bakteri anaerob pada usus besar yang telah dibuktikan baik secara *in vivo* dan *in vitro*. Prebiotik yang telah difermentasikan di usus besar dapat menghasilkan asam lemak rantai pendek (SCFA) (Antarini, 2011).

Inulin adalah polisakarida yang tersusun dari unit-unit monomer fruktosa melalui ikatan β -2-1 fruktofuransida yang diawali dengan satu molekul glukosa. Inulin dimanfaatkan sebagai pangan fungsional yang bersifat larut dalam air, mampu mencapai usus besar tanpa mengalami perubahan struktur karena tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim pencernaan. Inulin difermentasi dalam usus akibat aktifitas dari mikroflora pada usus besar sehingga dapat memberikan efek positif pada kesehatan tubuh (Indriyanti, 2015). Inulin memiliki sifat diantaranya berbentuk serbuk putih, cepat larut dalam air panas namun agak sulit larut dalam air dingin. Bakteri probiotik yang ada di dalam usus besar dapat memfermentasi inulin menjadi asam-asam lemak rantai pendek (Adebola *et al.*, 2014).

Beberapa tanaman Compositae, seperti chicory, dahlia, jerusalem artichoke dapat ditemukan inulin (Gupta *et al.*, 1992). Tanaman tersebut sering dimanfaatkan sebagai sumber penghasil inulin secara komersial karena memiliki kandungan inulin yang tinggi. Ketiga tanaman tersebut yang dapat dikembangkan di Indonesia hanya tanaman dahlia (Mangunwidjaja, 2009). Tanaman dahlia memiliki umbi yang mengandung karbohidrat inulin dan memiliki nilai fungsional sebagai bahan makanan. Kandungan inulin pada umbi dahlia segar yaitu dengan kadar 72,6%(bk), sedangkan kandungan inulin setelah proses ekstraksi lanjutan mengandung inulin murni sekitar 41,7% (bk) dari total inulin yang terkandung pada umbi (Widowati dkk.,2005).

2.3.2 *Lactobacillus casei* AP

Bakteri yang digunakan sebagai probiotik umumnya yaitu *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria*. Bakteri tersebut dapat meningkatkan kesehatan karena dapat menstimulasi respon imun dalam menghambat patogen. Kelompok bakteri

Lactobacillus sp. pada usus dapat menekan pertumbuhan patogen, mensintesis vitamin, membantu meningkatkan ketersediaan nutrisi dan merangsang fungsi kekebalan tubuh (imun) (Haryati, 2011). Bakteri *Lactobacillus* merupakan mikroba alami yang hidup di saluran pencernaan dan memiliki kemampuan untuk menempel pada sel inang dan sebagai bakteriosin yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Salah satu bakteri yang dimanfaatkan dalam probiotik yaitu *Lactobacillus casei* (Widodo, 2017). Probiotik merupakan makanan tambahan berupa sel-sel mikroba hidup, yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi hewan inang yang mengkonsumsinya melalui penyeimbangan flora mikroba intestinalnya (Fuller, 1987; Supriatna, 2016). Hal ini didukung oleh penjelasan (Salminen, 1999), Probiotik merupakan segala bentuk preparasi sel mikroba atau komponen sel mikroba yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi kesehatan dan kehidupan inang.

Lactobacillus casei tergolong dalam family *Lactobacillaceae*. Bakteri ini bersifat homofermentatif, berbentuk batang panjang, anaerobic fakultatif dan katalase negatif. Bakteri *Lactobacillus casei* merupakan bakteri anaerobik fakultatif atau mikroaerofilik dan termasuk genus bakteri Gram positif. Bakteri ini mampu hidup dengan baik pada 15°C–41°C dan pH 3,5 atau lebih dan tergolong streptokoki dalam kebutuhan akan nutrisinya (Meutia, 2003). *Lactobacillus casei* AP merupakan bakteri yang ditemukan pada saluran pencernaan manusia, mampu bertahan hidup pada kondisi asam, mengikat ke sel epitel pada GIT, memiliki kapasitas adhesi tinggi yaitu lebih dari 75% sel-sel mampu melekat pada mucin lambung, menghambat pertumbuhan patogen, dan mampu bertahan pada garam empedu (Widodo *et al.*, 2012).

Bakteri *L. casei* strain AP mampu menggunakan inulin sebagai sumber karbon (Widodo *et al.*, 2014). Kemampuan bakteri *L.casei* dalam mempertahankan diri pada keadaan buruk di saluran pencernaan tersebut sehingga bakteri *L. casei* mampu meningkatkan kapasitas makrofag dalam memfagosit *E. coli*. Hal ini dikarenakan *Lactobacillus* dapat menginduksi sitokin (Winarsih *et al.*, 2007).

2.4 *Lactobacillus* spp.

Lactobacillus merupakan genus terbesar dalam kelompok bakteri asam laktat yang terdiri dari 135 spesies dan 27 subspecies (Bernardeau, *et al.*, 2008). *Lactobacillus* adalah bakteri batang gram positif yang dapat ditemukan pada saluran pencernaan dan umumnya dimanfaatkan untuk membuat produk olahan terfermentasi misalnya keju, yoghurt, dan susu terfermentasi lainnya (Claesson *et al.*, 2007). Beberapa probiotik anggota *Lactobacillus*, diantaranya *L. achidophilus*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum* (Gibson, 1999).

Koloni *Lactobacillus* umumnya berwarna putih, cembung, rata, bulat, bergerombol dan berdiameter 2-5 mm. Sel *Lactobacillus* biasanya besar, mempunyai lebar 0.5-1 mikrometer dan panjang 1.5-5 mikrometer, berbentuk batang teratur, namun kadang tumbuh dengan bentuk kokus atau tidak tetap, tergantung ada kondisi kultur dan spesies (Salminen *et al.*, 1998). Media selektif untuk menumbuhkan *Lactobacillus* sp. adalah agar deMan-Rogosa-Sharpe Agar (MRS Agar) (Menon, 2007). Spesies *Lactobacillus* tumbuh secara optimal di bawah kondisi anaerob. Selain itu, *Lactobacillus* juga dapat tumbuh pada konsentrasi

oksigen yang rendah, jika lingkungan dilengkapi dengan karbondioksida sebesar 5-10%.

Genus *Lactobacillus* yang berpotensi sebagai agen probiotik karena mampu hidup pada kondisi pH rendah, tahan terhadap garam empedu, memproduksi antimikroba dan daya antagonistic terhadap patogen enterik, mampu mengasimiliasi serum kolesterol dan mendeconjugasi garam empedu serta dapat tumbuh baik pada medium sederhana (Rahayu, 2001). *Lactobacillus* ditemukan pada substrat yang kaya akan karbohidrat dengan berbagai habitat seperti membrane mukosa manusia dan binatang (rongga mulut, intestine, vagina) atau makanan hasil fermentasi dan makanan yang membusuk (Sunaryanto, 2014).

2.5 Usus Besar (Colon)

Usus merupakan organ pencernaan yang berfungsi dalam penyerapan nutrisi pada proses pencernaan (Soeharsono, 2010). Usus merupakan organ terpanjang pada saluran pencernaan yang dibedakan menjadi usus halus dan usus besar. Proses absorbs nutrisi terutama terjadi di dalam usus halus yang terdiri dari duodenum, yeyunum, dan ileum, sedangkan pada usus besar terjadi penyerapan air, fermentasi sisa ingesta dan pembentukan feses (Jacob, *et al.*, 2011).

Kolon berfungsi sebagai pengabsorpsi air dan elektrolit dari kimus sehingga menjadi tempat pembentukan feses yang padat dan tempat penyimpanan feses sementara hingga waktunya dikeluarkan (Guyton, 2008). Menurut Ganong (2008), Usus besar mampu mengubah kimus isotonic yang masuk setiap hari dari ileum sebanyak 1000-2000 mL menjadi tinja semipadat sebanyak 200-250 mL tinja semipadat. Pada usus besar terdapat kolon pengabsorpsi yang terdapat di

bagian pertengahan proksimal yang berfungsi sebagai pengabsorpsi. Sedangkan kolon bagian distal disebut kolon penyimpanan karena berfungsi sebagai tempat penyimpanan feses hingga waktunya dilakukan ekskresi. Pada kolon pengabsorpsi banyak terdapat bakteri, khususnya basil kolon. Bakteri-bakteri ini mampu mencernakan sedikit selulosa sehingga dapat menyediakan beberapa kalori nutrisi tambahan untuk tubuh (Guyton, 2008).

Produk fermentasi inulin oleh bakteri *Lactobacilli* menghasilkan *short chain fatty acid* (SCFA) yang telah dibuktikan secara *in vivo* dan *in vitro*. SCFA memiliki fungsi penting pada usus besar karena dapat menurunkan pH kolon yang dapat meningkatkan populasi bakteri *Lactobacilli* dan menurunkan pertumbuhan bakteri pathogen juga menurunkan aktivitas dari enzim-enzim yang mensintesis produk yang bersifat karsinogen dan toksik di dalam usus. SCFA menyumbangkan lebih dari 50% kebutuhan energy harian jaringan kolon dan berpengaruh pada metabolisme kolon. Selain itu, inulin juga dapat menurunkan resiko kanker kolon (Donkor 2007; Herminati 2015).

Usus besar merupakan bagian saluran pencernaan yang berperan penting dengan keberadaan mikrobia saluran pencernaan. Mikrobia yang berada di usus besar proksimal (bagian kanan) memiliki banyak suplai nutrisi makanan sehingga tumbuh lebih cepat dan menyebabkan penurunan pH akibat adanya produksi asam lemak rantai pendek. Pada usus besar distal (bagian kiri), ketersediaan nutrisi lebih rendah yang mengakibatkan bakteri tumbuh lebih lambat dan pH mendekati netral, sehingga tingkat heterogenitas yang tinggi ada pada bagian usus besar distal (bagian kiri) (Gibson dan Roberfroid, 1995; Widodo, 2017).

Mikrobakteria yang sering ditemukan pada usus besar adalah mayoritas bakteri anaerob, misalnya spesies *Bakteroides*, *Bifidobakterium* dan *Lactobacilli* (Andrew *et al.*, 2008; Widodo, 2017). *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* merupakan mikrobial alami dalam saluran pencernaan. *Lactobacillus* dalam saluran pencernaan berpotensi memberikan efek kesehatan bagi inang seperti mencegah terjadinya infeksi saluran pencernaan dan meningkatkan respon imun (Sharma *et al.*, 2005).

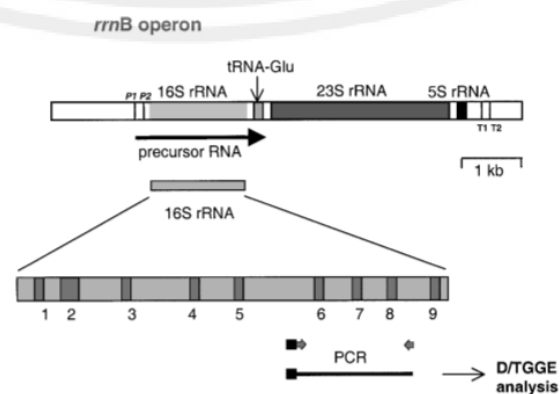
2.6 Gen 16S rRNA

RNA ribosom (rRNA) merupakan komponen inti pembentuk protein pada suatu makhluk hidup. Molekul rRNA memiliki fungsi yang identik pada seluruh organisme sehingga bersifat ubikuitas. Ribosom memiliki dua subunit, yaitu subunit kecil (*small subunit*) dan subunit besar (*large subunit*) dan merupakan ribonukleoprotein. RNA dalam ribosom prokaryota berdasarkan nilai koefisien sedimentasi terbagi menjadi tiga yaitu 5S, 16S, dan 23S rRNA. Gen 16S rRNA merupakan komponen ribosom prokariotik subunit 30S dan berfungsi pada pengenalan ujung 5'-mRNA serta memposisikan padatempat yang tepat di ribosom. Gen ini merupakan gen yang dapat ditemukan pada semua prokariotik, kromosom prokariotik tersusun atas subunit besar (50S) dan subunit kecil (30S). Subunit tersebut disusun oleh protein-protein dan molekul RNA yang disebut dengan RNA ribosom (rRNA). (Clarridge, 2004).

Gen 16S rRNA memiliki ukuran basa yang ideal untuk dianalisis. Hal ini dikarenakan gen 16S rRNA memiliki ukuran sekitar 1550 pasang basa dan sekitar 500 basa di bagian ujung sekuens merupakan daerah yang disebut dengan

hypervariable region. Daerah ini memiliki urutan basa yang berbeda diantara spesies sehingga dapat digunakan untuk membedakan antar organisme. Primer yang digunakan dalam amplifikasi sekuens akan mengenali daerah yang lestari dan mengamplifikasi *hypervariable region*, oleh karena itu dapat diperoleh sekuens yang khas pada organisme tersebut (Rinanda, 2011). Molekul 5S rRNA memiliki urutan 120 basa sehingga kurang cukup untuk dilakukan analisis statistika karena memiliki urutan basa yang pendek. Sedangkan molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang sekitar 2900 urutan basa sehingga menyulitkan dalam menganalisis (Pangastuti, 2006).

Perbandingan urutan basa gen 16S rRNA diantara genus *Lactobacillus* menunjukkan bahwa urutan basa tersebut mengandung informasi spesifik spesies. Untuk tujuan identifikasi, diperlukan amplifikasi dengan menggunakan PCR dan analisis urutan basa minimal 500 pasang basa (Petrosino *et al.*, 2009). Gen 16S rRNA terbagi menjadi sembilan bagian yang disebut dengan daerah V1 sampai V9. Disamping daerah V1-V3, daerah V6-V9 merupakan daerah divergen yang yang menentukan heterogenitas atau adanya mutasi gen yang mengarah pada perbedaan spesies suatu bakteri (Cai *et al.*, 2003; Petrosino *et al.*, 2009).



Gambar 2.1 Ilustrasi skematis operon rRNA dari *E.coli* (Vaughan *et al.*, 1999)

16S rRNA sebagai molekul yang memiliki ukuran yang relatif kecil sehingga dapat disekuensing secara langsung tanpa memerlukan cloning dari ampikon PCR yang dihasilkan. Metode amplikasi sekuen gen 16S rRNA dengan PCR telah dilakukan oleh Chagnaud *et al.*, (2001) bahwa amplikasi sekuen gen 16S rRNA menggunakan forward primer (spesifik untuk satu strain) yang didesain berdasarkan sekuen wilayah V1 dari gen 16S rRNA. Sedangkan reverse primer didesain pada wilayah lain dari gen 16S rRNA yang bersifat genus spesifik untuk bakteri asam laktat (BAL). Pengikatan yang terjadi pada ribosom prokariot terjadi pada 16S rna di bagian subunit 30S, karena pada mRNA prokariot terdapat urutan basa tertentu yang disebut dengan tempat pengikatan ribosom (*ribosom binding site*) atau urutan Shine-Dalgarno (5'-AGGAGGU-3'). Urutan tersebut spesifik dikenali oleh 16S rRNA. Oleh karena itu, sekuen 16S rRNA berfungsi sebagai sekuen anti-Shine Dalgarno. Gen 16S rRNA berukuran panjang antara 1500 hingga 1550 pb dan kaya akan basa nitrogen guanine dan sitosin (G+C) (Moat et al, 2002). Gen ini juga memiliki daerah konservatif yang umumnya memiliki beberapa ukuran kisaran 500-540 bp yang letaknya tersebar (Jusuf, 2001).

Kemampuan gen 16S rRNA dapat digunakan dalam mengidentifikasi spesies karena gen 16S rRNA memiliki daerah *hypervariable region*. Selain itu, gen ini memiliki daerah konservatif dan variatif yang dapat digunakan untuk penentuan spesies dan pembuatan pohon filogenik. Hal ini seperti yang tersirat pada hadits Nabi sebagai berikut 16S

إِنَّ اللَّهَ تَعَالَى خَلَقَ آدَمَ مِنْ قَبْضَةٍ قَبَضَهَا مِنْ جَمِيعِ الْأَرْضِ فَجَاءَ بَنُو آدَمَ عَلَى قَدَرِ الْأَرْضِ فَجَاءَ مِنْهُمْ الْأَحْمَرُ وَالْأَبْيَضُ وَالْأَسْوَدُ وَبَيْنَ ذَلِكَ وَالسَّهْلُ وَالْحَزْنُ وَالْخَبِيثُ وَالطَّيِّبُ

Artinya: “Sesungguhnya Allah Ta’ala menciptakan Adam dari segenggam yang digenggam-Nya dari semua tanah di muka bumi. Oleh karena itu, anak cucu Adam hadir **sesuai keadaan tanah (warna dan tabiatnya)**, maka di antara mereka ada yang berkulit merah, putih, hitam, dan antara itu ada pula yang lunak, keras, yang jelek dan yang baik.” (HR. Tirmidzi).

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُتَجَوِّرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِّنْ أَعْنَابٍ وَزُرْعٌ وَنَخِيلٌ صِنَوَانٌ وَغَيْرُ صِنَوَانٍ يُسْقَى بِمَاءٍ وَاحِدٍ وَنُفِضِلُ بَعْضَهَا عَلَى بَعْضٍ فِي الْأَكْلِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ

Artinya:

Dan di bumi terdapat bagian-bagian yang berdampingan, kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman, pohon kurma yang bercabang, dan yang tidak bercabang: **disirami air yang sama, tetapi Kami lebihkan tanaman yang satu dari yang lainnya dalam hal rasanya.** Sungguh, pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang-orang yang mengerti (Ar Ra’du: 4)

Bumi juga mengandung berbagai keajaiban. Ada kepingan-kepingan tanah yang saling berdekatan. Meskipun demikian, jenis tanahnya dapat berbeda-beda. Ada yang kering tandus, ada pula yang basah subur. Ada pula tanah yang meskipun jenisnya sama akan menjadi lahan perkebunan anggur, lahan persawahan, dan lahan perkebunan korma. Kebun-kebun tersebut ada yang berkumpul di atas satu area, ada pula yang tumbuh berpisah-pisah. Selain itu, meskipun kebun-kebun itu disiram dan tumbuh dari sumber air yang sama, rasa yang dihasilkan oleh buah-buahannya beraneka ragam. Sungguh di dalam

keajaiban alam itu benar-benar terdapat bukti yang jelas atas kemahakuasaan Allah bagi orang yang memiliki akal dan mau berfikir (Shihab, 2003).

Pada hadits dan ayat tersebut dijelaskan bahwa Allah telah menciptakan makhlukNya secara beragam dengan adanya perbedaan sifat fenotip yang tentunya memiliki perbedaan pada sifat genotip. Hal tersebut menyebabkan adanya perbedaan urutan basa pada tiap spesies yang dapat dijadikan patokan untuk menentukan spesies. Ayat al quran dan hadits tersebut juga menunjukkan adanya hereditas pada setiap makhluk hidup.

Molekul 16S rRNA memiliki sifat ubikultus dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme sehingga dapat digunakan sebagai penanda molekuler. Molekul ini juga dapat digunakan sebagai kronometer evolusi yang baik karena molekulnya dapat berubah sesuai jarak evolusinya. 16S rRNA memiliki beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan variatif. Perbandingan urutan basa yang konservatif mengalami perubahan yang relatif lambat sehingga digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal. Gen penyandi 16S rRNA praktis digunakan untuk definisi spesies karena 16S rRNA memiliki sifat ubikultus sehingga dapat dirancang suatu primer yang universal untuk seluruh kelompok (Pangastuti, 2006).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksploratif kualitatif, yaitu mengidentifikasi keberadaan bakteri *Lactobacillus casei* pada usus besar yang telah terinfeksi oleh bakteri *Escherichia coli* dengan sekuen gen 16S rRNA.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2017-November 2018. Penelitian ini bertempat di Laboratorium Mikrobiologi, Hewan Coba, dan Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Obyek Penelitian

Obyek penelitian ini adalah bakteri isolat *Lactobacillus casei* AP yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu cawan petri, jarum ose, *waterbath shaker*, autoklaf, LAF (*Lamina Air Flow*), *vortex*, mesin sentrifugasi, mikropipet (5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l), *microtube* (0.5 mL, 1 mL, 2 mL), sonde, alat pembedah, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, *refrigerator*, neraca analitik, Erlenmeyer, *hotplate*, NanoDrop, autoklaf, gelas ukur, cetakan agar,

microwave oven, perangkat elektroforesis merk BioRAD, wadah EtBr, mesin PCR (*thermal cycler*) seri BioRAD, jarum ose, dan mesin UV *transluminator* (Gel Doc) seri BioRAD, *safety tools*, Bunsen.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mencit jantan galur Balb C strain *L.casei* AP yang telah teridentifikasi pada penelitian sebelumnya (Widodo *et al.*, 2012; Widodo *et al.*, 2014) , Bakteri *E. coli*, LBS Broth (*Lactobacillus selective*), LBS Agar, aquades, etanol, NaCl, EDTA, potassium asetat, asam asetat glasial, lysozyme, RNase, proteinase K, SDS, Tris HCl, yogurt dan inulin umbi dahlia, gel agarose, loading dye, primer.

3.5 Prosedur penelitian

3.5.1 Persiapan hewan coba

Sebanyak 35 ekor mencit jantan dewasa diadaptasi selama 14 hari dengan diberi pakan CP 551. Kemudian dibagi menjadi 5 kelompok yang tiap kelompok terdiri dari 7 ekor mencit. 2 kelompok masing-masing sebagai kontrol positif dan negatif dan 3 kelompok sebagai perlakuan. Mencit jantan dewasa kontrol positif dan 3 kelompok mencit jantan dewasa sebagai perlakuan diberi injeksi bakteri *E.coli* sebanyak 0.5 mL dengan pengenceran 10^{-7} melalui injeksi oral selama 3 hari.

3.5.2 Perlakuan hewan coba

Pada mencit kelompok 1 sebagai kontrol negatif (K-) tanpa diberi injeksi bakteri *E.coli* dan mencit kelompok 2 sebagai kontrol positif (K+) diberi injeksi bakteri *E.coli* tanpa diberi injeksi sinbiotik. Sedangkan mencit pada kelompok 3

diberi injeksi bakteri *E.coli* dan diberi sinbiotik sebanyak 0.3 mL sebagai perlakuan pertama (P1), mencit kelompok 4 diberi injeksi bakteri *E.coli* dan diberi sinbiotik sebanyak 0.45 Ml sebagai perlakuan kedua (P2) dan pada mencit kelompok 5 diberi injeksi bakteri *E.coli* dan diberi sinbiotik sebanyak 0.6 mL sebagai perlakuan ketiga (P3). Pemberian sinbiotik dilakukan selama 5 hari dengan parameter feses mencit tidak lembek. Kemudian pada hari ke-6 mencit didislokasi dengan diambil bagian usus besarnya untuk dianalisis lebih lanjut.

3.5.3 Pembuatan kultur bakteri

Bagian usus besar dari mencit yang telah diberi perlakuan dan didislokasi kemudian diambil bagian usus halusnya. Selanjutnya dipotong sepanjang 1 cm. usus dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah terisi media selektif LBS Broth 3 mL dan diinkubasi selama 24 jam. Kemudian 1 mL cairan hasil inkubasi diambil dan dilakukan pengenceran serial sampai 10^{-9} .

Larutan hasil pengenceran 10^{-9} dikultur pada media LBS Agar dengan metode pour plate dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi selama 24 jam lalu diamati koloni bakteri yang tumbuh pada media cawan. Selanjutnya cawan petri yang berisi media padat LBS Agar disiapkan, kemudian 1 koloni dominan dari biakan diambil dengan jarum ose steril, kemudian jarum ose digoreskan pada media padat secara hati-hati. Cawan petri diinkubasi selama 24 jam. Pada akhir masa inkubasi, koloni-koloni yang tumbuh pada permukaan medium diperiksa dengan seksama. Dicari koloni yang terpisah, koloni yang terpisah ini adalah koloni yang berbentuk sekumpulan sel dari satu jenis saja.

3.5.4 Isolasi DNA bakteri genom

Kultur bakteri *L.casei* yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C diambil sebanyak 3 mL kemudian disentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan 12000 rpm. Supernatan dibuang dan pellet digunakan dengan penambahan 2 mL of NaCl-EDTA (30Mm NaCl, 2 mM EDTA, pH 8.0) dan diresuspensi dalam 100 µL pada buffer. Ditambahkan 100 µL lysosim (10 mg/ml dalam NaCl-EDTA) dan dicampurkan. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dengan diaduk secara periodik. Ditambahkan RNase sebanyak 1µL (20 mg/mL). kemudian ditambahkan 50 µL SDS, 10 µL proteinase K dan NaCl-EDTA sampai pada volume 500 µL. Kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 55°C. setelah diinkubasi, ditambahkan sebanyak 200 µL larutan presipitasi protein (6 mL 5 M potassium asetat, 1.15 mL asam asetat glasial, dan 2.85 mL aquades) kemudian divortex dengan kecepatan sedang selama 20 detik dan simpan pada es selama 5 menit. Selanjutnya, disentrifugasi selama 3 menit pada suhu 12000 rpm. Supernatan ditransfer pada tube bersih 1.5 mL. Supernatan dipresipitasi dengan 600 µL isopropanol dingin dengan disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm, suhu ruang selama 3 menit. Supernatant dibuang dan pellet dicuci satu kali dengan etanol 70% dan dikeringkan. Pellet dilarutkan dalam 100 µL buffer TE (10 mM Tris HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0) kemudian disimpan pada suhu 65°C selama 15 menit dan disimpan pada suhu -20°C untuk analisis selanjutnya (Kaur *et al*, 2010; Golchin *et al*, 2016).

3.5.5 Elektroforesis

Langkah awal elektroforesis yaitu dengan menyiapkan *tray*/cetakan gel untuk membuat gel elektroforesis. Memastikan cetakan dalam posisi bidang datar

dengan menggunakan *waterpass*. Sisi cetakan yang terbuka dikunci dengan menggunakan slot khusus yang telah disediakan. Gel agarosa dibuat dengan konsentrasi 0.7% dalam buffer TBE 1X. Pembuatan gel agarosa 0.7% dilakukan dengan menimbang sebanyak 0.21 gram bubuk agarosa dan dilarutkan dalam 40mL buffer TBE 1X. Gel agarosa agarosa dididihkan dengan microwave sampai agar larut dan berwarna bening. Gel agarose yang sudah hangat-hangat kuku dituangkan ke dalam cetakan yang dilengkapi dengan sisir (*comb*) tempat aplikasi sampel. Sisir dipasang dengan posisi tegak dan berjarak 0.5-1 mm dari dasar cetakan. Gel dibiarkan mengeras pada suhu ruang. Gel dan cetakannya kemudian direndam pada buffer TBE 1X pada kolom elektroforesis.

Sampel dari hasil isolasi dimasukkan dalam sumuran sebanyak 3 μ l dan *loading dye* sebanyak 1 μ l (3:1). Kemudian sampel dielektroforesis pada tegangan 65 volt selama 70 menit. Gel berisi DNA hasil elektroforesis diwarnai menggunakan EtBr (Etidium Bromide) selama lima menit. Kemudian dibilas menggunakan aquades untuk membuang kelebihan EtBr. Gel hasil elektroforesis diamati dengan sinar UV (UV transilluminator). Fragmen DNA yang muncul didokumentasikan menggunakan kamera digital.

3.5.6 Pengukuran Konsentrasi Dan Kemurnian DNA

Pengujian kuantitatif DNA genom hasil isolasi pada penelitian ini dilakukan menggunakan alat NanoDrop. Sampel DNA genom hasil isolasi diambil sebanyak 1 μ l dan diletakkan ke tempat sampel pada NanoDrop. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan nilai absorbansi pada panjang gelombang (260 nm dan 280 nm). Uji kemurnian genom diukur dengan

menghitung nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm. Molekul DNA dapat dikatakan murni jika berada pada nilai 1.8-2.0. jika nilai rasionya lebih kecil dari 1.8 maka isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan berupa fenol dan pelarut yang digunakan terlalu banyak. jika nilai rasionya lebih besar dari 2.0 maka isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan berupa protein dan senyawa lainnya. Nilai kemurnian DNA ditentukan oleh tingkat kontaminasi dari protein dan fenol dalam larutan (Sambrook dan Russell, 2001).

3.5.7 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Amplifikasi gen 16S rRNA pada penelitian ini digunakan total volume dalam PCR yaitu 25µl yang terisi master mix 2x, 5µl DNA template, primer sebanyak 2.5µl dan dH₂O sampai pada volume 50 µl

Proses amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 35 siklus dengan pre denaturasi pada suhu 95°C selama 10 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, tahap annealing pada suhu 52°C selama 1 menit, elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit dan post elongasi pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil yang diperoleh selanjutnya divisualisasi dengan 1.7% gel agarose selanjutnya (Golchin *et al*, 2016).

3.6 Analisis Data

Sekuensing dilakukan menggunakan jasa dari Bioneer Korea Selatan dan hasil sekuensing dilakukan analisis data kasar menggunakan *software Seqscanner*. Selanjutnya dilakukan analisis menggunakan web NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

BLAST) program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) secara online (Haddad, *et al.*, 2014).



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Pemberian Sinbiotik pada Mencit Diare Terhadap Konsistensi Feses

Penelitian deteksi *Lactobacillus* spp. pada mencit diare pasca pemberian sinbiotik menggunakan 16S rRNA dilakukan pengamatan konsistensi feses pada mencit diare. Data konsistensi feses pada mencit diare dan pasca pemberian sinbiotik sebagaimana yang ditampilkan pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Data Konsistensi Feses Mencit

No	Perlakuan	EPEC	Pemberian Sinbiotik
1	K-	Normal	Normal
2	K+	Berdarah	Berair
3	P1	Berair	Normal
4	P2	Berdarah	Normal
5	P3	Berdarah	Normal

Berdasarkan Tabel 4.1 konsistensi feses pada mencit diare dan pasca pemberian sinbiotik didapatkan hasil yang berbeda antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Pada kontrol negatif (K-) feses terlihat normal sedangkan pada kontrol positif (K+) feses terlihat berair dan berdarah. Menurut Aman (2015) mencit mengalami diare apabila kondisi feses lembek sampai berdarah hingga feses tidak berbentuk.

Konsistensi feses pada perlakuan pertama (P1), kedua (P2) dan ketiga (P3) pasca pemberian sinbiotik memiliki konsistensi feses normal seperti feses pada kontrol negatif. Hal ini menandakan bahwa bakteri *Lactobacillus casei* AP mampu melakukan kompetisi dengan bakteri EPEC pada saluran pencernaan

sehingga tidak terjadi diare. Sebagaimana penjelasan Haryati (2011), bakteri probiotik seperti *Lactobacillus* dapat menekan pertumbuhan patogen, mensintesis vitamin, membantu meningkatkan ketersediaan nutrisi dan merangsang fungsi kekebalan tubuh pada saluran pencernaan.

4.2 Isolat Bakteri *Lactobacillus* dari Usus Besar Mencit Diare Pasca Pemberian Sinbiotik

Penelitian deteksi *Lactobacillus* spp. pada mencit diare pasca pemberian sinbiotik menggunakan 16S rRNA dilakukan pengamatan secara *in vitro* pada media LBS agar. Pengamatan dilakukan dengan melihat koloni yang tumbuh pada media LBS agar. Koloni yang tumbuh pada media LBS agar didapatkan hasil yang berbeda-beda antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Hasil koloni yang tumbuh pada media LBS agar dapat dilihat pada Gambar dan Tabel 4.2



Gambar 4.1 Koloni *Lactobacillus* yang tumbuh pada media LBS agar (anak panah). (a) kontrol negatif (b) kontrol positif (c) perlakuan pertama (d) perlakuan kedua (e) perlakuan ketiga.

Tabel 4.2 Jumlah Koloni *Lactobacillus* pada media LBS agar

No.	Perlakuan	Σ Koloni <i>Lactobacillus</i> (10^9) (CFU/mL)
1.	K-	114
2.	K+	56
3.	P1	247
4.	P2	267
5.	P3	285

Berdasarkan Gambar 4.2 diperoleh hasil bahwa pada kontrol negatif terlihat memiliki jumlah koloni *Lactobacillus* lebih banyak dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini dikarenakan pada perlakuan kontrol negatif tanpa pemberian injeksi *E.coli* sehingga tidak terjadi kompetisi bakteri patogen dengan *Lactobacillus*. Koloni *Lactobacillus* yang tumbuh pada kontrol negatif merupakan mikroflora yang ada pada usus dan sebagai bakteri probiotik. Hal ini seperti yang dijelaskan oleh Widodo (2017), mikrobakteria yang sering ditemukan pada usus besar adalah mayoritas bakteri anaerob, misalnya spesies *Bakteroides*, *Bifidobakterium* dan *Lactobacilli*. Pada kontrol positif *Lactobacillus* terjadi kompetisi dengan bakteri patogen karena diberi injeksi *E.coli*. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 4.2 bahwa jumlah koloni *Lactobacillus* pada K- sebanyak 114×10^9 CFU/mL dan jumlah koloni *Lactobacillus*.

Jumlah koloni *Lactobacillus* pada perlakuan pertama, kedua dan ketiga masing-masing sebagai berikut: 247×10^9 CFU/mL, 267×10^9 CFU/mL dan 285×10^9 CFU/mL. Koloni yang tumbuh tersebut menandakan adanya kompetisi antara bakteri patogen dan *Lactobacillus*. Hal ini sesuai dengan penjelasan Jankowska *et al.* (2008) bahwa bakteri asam laktat dapat mencegah perlekatan bakteri patogen dengan mengurangi kolonisasi dan mengurangi infeksi. Hal ini juga dikarenakan pemberian sinbiotik pada mencit diare dimana dosis sinbiotik yang diberikan pada perlakuan ketiga 2 kali lebih banyak dibandingkan pemberian dosis sinbiotik pada perlakuan kedua dan pertama. Koloni yang digunakan pada pengujian lanjut yaitu diperoleh dari perlakuan ketiga. Hal ini berdasarkan dari penelitian Amrullah (2018) bahwa dosis yang efektif dalam mengembalikan

konsistensi feses menjadi normal adalah pada kelompok perlakuan 3 yang memiliki perlakuan produk sinbiotik 0,6 ml.

4.3 Deteksi *Lactobacillus* spp. pada mencit diare pasca pemberian sinbiotik menggunakan 16S rRNA

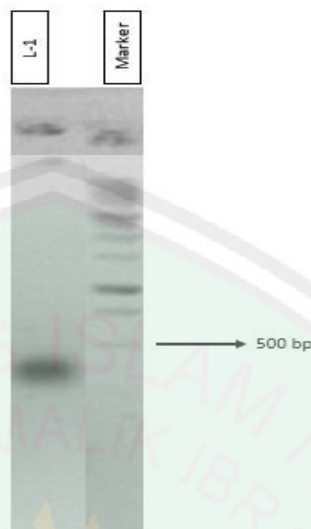
Penelitian deteksi *Lactobacillus* spp. pada mencit diare pasca pemberian sinbiotik menggunakan 16S rRNA juga dilakukan analisis molekuler secara kuantitatif dan kualitatif. Uji secara kuantitatif dilakukan menggunakan analisis spektrofotometri sedangkan uji secara kualitatif dilakukan amplifikasi PCR pada elektroforesis. Hasil uji kuantitatif pada penelitian disajikan pada Tabel 4.3.1

Tabel 4.3 Hasil Uji kuantitatif DNA dengan nanodrop

No	Sampel	A _{260/280}	Konsentrasi (ng/μl)
1.	Isolat L-1	1.74	183.32

Berdasarkan Tabel 4.3 hasil uji kuantitatif DNA dengan nanodrop pada penelitian ini diketahui bahwa nilai kemurnian isolat L-1 menunjukkan kontaminasi protein sehingga konsentrasi proteinase K. Menurut Sambrook *et al.* (1989), sampel DNA dikatakan murni jika nilai absorbansi 260 terhadap nilai absorbansi 280 berada diantara 1,7-2,0. Nilai kemurnian isolat L-1 yang mendekati nilai standar 1,7-2,00 tidak menjadi masalah karena konsentrasi DNA dalam mikrolitnya masih teridentifikasi ratusan.

Visualisasi hasil PCR pada penelitian ini dilakukan dengan elektroforesis pada gel agarosa ditampilkan pada Gambar 4.3



Gambar 4.2 Visualisasi pita DNA hasil PCR pada gel agarose 1.5%

Berdasarkan Gambar 4.3 hasil visualisasi PCR menunjukkan bahwa isolat L-1 berada sejajar dengan marker yang berukuran 428 bp. Hal tersebut menandakan bahwa isolat L-1 memiliki panjang sekuen sekitar 500 bp. Menurut Rinanda (2011) bahwa gen 16S rRNA memiliki panjang sekitar 1550 bp dan sekitar 500 basa di bagian ujung sekuen merupakan daerah *hypervariable region*, daerah ini merupakan bagian yang membedakan antar organisme. Jumlah sekuen isolat L-1 yang memiliki ukuran dibawah 1500 bp tersebut masih dapat dilakukan analisis identifikasi. Hal ini telah dilakukan penelitian serupa oleh Tajabadi *et al.*, (2013) yang menggunakan primer yang sama pada penelitian ini yaitu 27F dan 1429R, isolat Taj-Arash 1 dengan panjang 919 bp sebagai *Lactobacillus kunkeii*.

Terbentuknya pita DNA pada penelitian ini merupakan salah satu kemaha Besar-an Allah dalam menciptakan sesuatu. Allah menciptakan sesuatu dengan tepat dan sempurna termasuk dalam penciptaan molekul DNA. Hal ini secara implisit, Allah berfirman dalam surat Al Furqon ayat 2 sebagai berikut:

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ
فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا

Artinya: Yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan(Nya), dan **dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya**”(Q.S. Al-Furqon:2)

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah telah menciptakan apa-apa yang ada di muka bumi ini dengan ukuran sehingga Allah menciptakan segala sesuatunya diciptakan berdasarkan ketentuan-Nya bukan karena nafsu dan kelalaian (Aidh, 2007).

Kata كل شيء bermakna bahwa Allah yang menciptakan semua ciptaan, seperti DNA genom yang terdapat dalam makhluk hidup, kemudian kata فَقَدَرَهُ bermakna bahwa Allah menetapkan ukuran-ukuran segala makhluknya, termasuk penciptaan DNA genom setiap makhluk hidup dengan ukuran yang sangat rapi dan tepat (تقديرًا), sehingga semua ciptaan Allah merupakan ciptaan yang terbaik dan sempurna, tidak ada tandingannya sebagai bentuk keMaha Agungan Allah. Oleh karenaNya, semua sistem di muka bumi ini dapat berjalan dengan rapi dan teratur.

Hasil PCR isolat L-1 selanjutnya dilakukan proses sekuensing. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan sekuen yang dapat digunakan dalam menganalisis kemiripan sekuen isolat L-1 dengan organisme lainnya. Untuk melihat kemiripan sekuen tersebut dilakukan analisis menggunakan program *Basic Local Allignment Search Tool* (BLAST). Hasil dari BLAST isolat L-1 terdapat pada Tabel 4.3.2.

Tabel 4.4 Hasil BLAST isolat L-1 pada mencit diare pasca pemberian sinbiotik

No.	Kode Isolat	Hasil Blast		
		Nama Spesies	Ident (%)	Seq Id
1.	L-1	<i>Lactobacillus casei</i> strain NWAUFU1554	97	MG551230.1

Berdasarkan hasil BLAST pada tabel 4.3 dapat diketahui bahwa isolat L-1 memiliki kemiripan dengan *Lactobacillus casei* strain NWAUFU1554 dengan presentase kemiripan sebesar 97% (Lampiran 4). Hal ini menunjukkan bahwa isolat L-1 merupakan *Lactobacillus casei*. Menurut Widodo (2017) bahwa dalam satu spesies hanya terdapat sekitar 3% perbedaan urutan sekuen gen 16S rRNA atau sekitar 97% homologi sekuen yang dimiliki dalam satu spesies. Hal ini juga dijelaskan oleh Tannock (1999). Urutan basa antar isolat *Lactobacillus* dinyatakan secara homolog jika nilai kemiripannya (similaritasnya) minimal 94%.

Isolat L-1 yang menunjukkan adanya kemiripan dengan bakteri *Lactobacillus casei* dapat digunakan sebagai landasan bahwa sinbiotik *Lactobacillus casei* AP dan inulin umbi dahlia mampu menghambat pertumbuhan EPEC sehingga dapat mencegah diare. Hal ini menunjukkan bahwa sinbiotik dapat digunakan sebagai alternatif obat diare. Seperti yang dijelaskan oleh Widodo (2017) bahwa probiotik yang berada pada permukaan sel mukosa mempunyai sifat penempelan yang lebih tinggi dibanding bakteri patogen sehingga dapat mencegah bakteri patogen menempel dan merusak usus. Adanya mekanisme tersebut menyebabkan tidak terjadinya diare.

Penempelan bakteri probiotik pada permukaan usus dapat mengurangi kolonisasi bakteri patogen di usus. Keberadaan bakteri probiotik pada usus didukung dengan adanya prebiotik. Peran prebiotik dalam mendukung probiotik untuk mencegah diare sangat diperlukan karena prebiotik mampu menyeimbangkan kolonisasi bakteri probiotik dalam usus dan merupakan substrat mikroflora pada usus. Hal ini seperti yang dijelaskan oleh Horizo (2017) prebiotik adalah suplemen makanan yang berfungsi sebagai substrat mikroflora usus. Hal ini juga dijelaskan oleh Gibson (2001) inulin seperti halnya frukto-oligosakarida adalah bahan pangan yang mampu menyeimbangkan populasi BAL dalam usus.

Keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan memiliki peranan penting pada sistem tubuh agar tidak terjadi gangguan pada saluran pencernaan. Populasi bakteri probiotik dan patogen dalam saluran pencernaan harus seimbang agar tidak terjadi gangguan pada saluran pencernaan misalnya diare. Pentingnya keseimbangan dalam sistem tubuh makhluk hidup ini sebagaimana secara implisit dijelaskan dalam surat Ar Rahman ayat 8:

أَلَّا تَطْغَوْا فِي الْمِيزَانِ ۝

Artinya:

Supaya kamu jangan melampaui batas **tentang timbangan itu** (Ar Rahman:8).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa jika Allah tidak menurunkan keseimbangan dan menyerahkan perkara kepada akal sehat manusia yang terbatas, tentu akan terjadi kerusakan yang besar dan hanya diketahui oleh Allah SWT sehingga terjadi kehancuran di muka bumi ini (Kemenag RI, 2011).

Keberadaan mikrobia bakteri patogen dan probiotik pada saluran pencernaan jika tidak seimbang maka akan terjadi gangguan misalnya diare. Hal ini akan mengganggu sistem tubuh makhluk hidup. Jumlah bakteri patogen dan probiotik yang tidak seimbang dapat dikarenakan oleh beberapa sebab, salah satunya pola makan yang kurang seimbang dan santasi makanan.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa isolat L-1 yang terdeteksi pada mencit diare pasca pemberian sinbiotik menggunakan 16S rRNA adalah *Lactobacillus casei* strain NWAUFU1554 dengan nilai indeks kemiripan sebesar 97%.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu perlu dilakukan pemberian obat kimia untuk diare sebagai pembanding sinbiotik sehingga produk sinbiotik dapat menjadi alternatif obat diare dan memastikan kembali kondisi mencit benar-benar mengalami diare dengan parameter selain melihat konsistensi feses. .

DAFTAR PUSTAKA

- Adebola, O.O., Corcoran, O. & Morgan, W.A. 2014. Synbiotics: The Impact Of Potential Prebiotics Inulin, Lactulose And Lactobionic Acid On The Survival And Growth Of Lactobacilli Probiotics. *Journal of Functional Foods* Vol.10: 75–84
- Aidh, Al Qarni. 2007. *Tafsir Muyassar*. Jakarta: Qisthi Press
- Aman, Mona,.A.C. 2015. Gambaran Gejala Dan Tanda Klinis Diare Akut Pada Anak Karena *Blastocystis Hominis*. *Jurnal E-Clinic (Ecl.)*. Vol. 3. No.1
- Amrullah, Harits. 2018. Pengaruh Pemberian Produk Sinbiotik Pada Mencit (*Mus Muculus*) Jantan Galur *Balb/C* Model Diare Terhadap Kadar *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) [skripsi]. Malang:UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Antarini, Anak A., N.,. 2011. Sinbiotik antara Probiotik dan Prebiotik. *Jurnal Ilmu Gizi*, Vol.2 No.2
- Anggreli, Citra A., Dewi Anggraini, Maya Savira. 2015. Gejala Penyerta Pada Balita Diare Dengan Infeksi Enteropathogenic Escherichia Coli (Epec) Di Puskesmas Rawat Inap Kota Pekanbaru. *JOM FK* . Vol. 2 No. 1
- Chagnaud, P.,K. Machins, L.A. Coutte, A.Marecat, and A. Mercenier 2001. Rapid PCR-based Procedure to Identify Lactic Acid Bacteria: Application to Six Common *Lactobacillus* Species. *J. Microbiol Methods*.Vol. 44:139-148
- Chakravorty, S., D. Helb, M Burday, N. Connell, dan D. Alland. 2007. A Detailed Analysis of 16S ribosomal RNA Gene Segments for the Diagnosis of Pathogenic Bacteria. *J Microbial Methods*. Vol.69. No.2: 330-339
- Chavarri, M., Maranon, L., Ares, R., Ibanez, F.C., Marzo, F., Villaran, M.D.C. 2010. Microencapsulation of a Probiotic and Prebiotic in Alginate—Chitosan Capsules Improves Survival in Stimulated Gastro-Intestinal Conditions. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 142. No.1-2: 185-189
- Clarridge, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol.17 No.4: 840-862
- Departemen Agama RI.1994. *Al Qur'an dan Terjemahannya*: Juz 1-30. Jakarta: PT. Kumudasmoro Grafindo Semarang

- Duncan, S.H. & Flint, H.J. (2013). Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. *Maturitas*, Vol. 75 No.1: 44–50
- Donnenberg, Michael S.ed. 2002. *Escherichia coli Virulence Mechanisms of a Versatile pathogen*: Elsevier Inc
- Ganong and William F. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran 22*. Jakarta: EGC
- Gupta, A. K., Kaul, N. and Singh, R. A. 1992. Comparison of Properties of Inulinases of *Fusarium oxysporum* Immobilized on Various Supports. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* Vol. 53: 293-296
- Gibson, G.R., dan Roberfroid, M.B. 2004. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition* Vol. 125. No. 6: 1401-1412
- Guyton and Hall. 2008. *Fisiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC Medical Publisher
- Haryati, Tuti. 2011. Probiotik Dan Prebiotik Sebagai Pakan Imbuhan Nonruminansia. *Wartazoa* Vol. 21 No. 3
- Herminiati, Ainia., Rimbawan, Budi Setiawan, Dewi Apri Astuti, Linar Zalinari Udin. 2015. Karakteristik Yoghurt Kering Yang Diperkaya *Difructose Anhydride* Iii Dari Umbi Dahlia Sebagai Minuman Fungsional. *Agritech*. Vol. 35. No. 2
- Humrah, Iis S., Ameli a Wong, Sitti Mukarramah. 2018. Gambaran Pengetahuan Ibu Balita Dalam Penanganan Awal Balita Diare Di Desa Bone Kec. Bajeng Kab. Gowa Tahun 2017. *Jurnal Bidan "Midwife Journal"*. Vol. 5. No. 01
- Indriyanti, Wiwik., Rizki Desvianto, Sulistiyansih, Ida Musfiroh. 2015. Inulin dari Akar Jombang (*Taraxacum officinale* Webb.) sebagai Prebiotik dalam Yoghurt Sinbiotik. *IJPST* Vol. 2. No. 3
- Jacob J, Pescatore T, Cantor A. 2011. *Avian digestive system*. Lexington (US): Cooperative Extension Service, University of Kentucky
- Jankowska, Alicja., Daniel Laubitz, Hanna Antushevich, Romuald Zabielski, and Elżbieta Grzesiuk. 2008. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for Adhesion to Caco-2 Cells. *J Biomed Biotechnol*
- Jusuf, M. 2001. *Genetika 1: Struktur & Ekspresi Gen*. Bogor:IPB
- Kastir, Ibnu. 2003. *Tafsir al Qur'an al Azîm*. Al Qahirah: Darul-Hadis

- Kelleher, S. I. Casas, N. Carbaja, & B. Lonnedal. 2002.. Supplementation Of Infant Formula With The Probiotic *Lactobacillus Reuteri* And Zinc : Impact On Enteric Infection Nutrition In Infant Rhesus Monkeys. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr*
- Kemenag RI, 2011. *Al - Qur'an dan Terjemahnya*. Jakarta: Adhi Aksara Abadi Indonesia
- Kliegman RM, Marcadante KJ, Behrman RE, editor. 2006. Nelson essentials of pediatric. Edisi 5. Philadelphia: Elsevier Saunders
- Kusmiyati, Nur., Tutik Dwi Wahyuningsih, Widodo. 2018. Prebiotic Effect of Inulin Extract from Dahlia Tubers (*Dahlia pinnata* L.) On the Growth Performance of Intestinal-origin *Lactobacillus casei* AP. *Pakistan Journal of Nutrition*. Vol. 17 No.8: 405-410
- Lolopayung, Mardayani,. Alwiyah Mukaddas, Ingrid Faustine2. 2013. Evaluasi Penggunaan Kombinasi Zink Dan Probiotik Pada Penanganan Pasien Diare Anak Di Instalasi Rawat Inap Rsud Undata Palu Tahun 2013
- Machado, M.T.C., Kaliaha, S.E., Vieira, G.S., Menegalli, F.C., Martínez, J. & Hubinger, M.D. 2015. Prebiotic Oligosaccharides From Artichoke Industrial Waste: Evaluation Of Different Extraction Methods. *Industrial Crops and Products*, Vol.76: 141–148
- Mangunwidjaja, D., Rahayuningsih, M., Purwoko. 2011. *Biokonversi Inulin Umbi Dahlia menjadi Fruktosa dan Fruktooligosakarida*. Artikel 101 Inovasi Indonesia 2009. Departemen Teknologi Industri. IPB
- Meutia, Y.R. 2003. Evaluasi Potensi Probiotik Isolat Klinis *Lactobacillus* sp. Secara *In Vitro* dan *In Vivo*. {Skripsi}. Ilmu dan Teknologi Pangan. Fakultas Teknologi. Institut Pertanian Bogor: Bogor
- Muttaqin, Gusti M E., Edi Hartoyo, Dona Marisa. 2016. Gambaran Isolat Bakteri Aerob Diare Pada Anak Yang Dirawat Di Rsud Ulin Banjarmasin Tahun 2015. *Berkala Kedokteran*. Vol.12 No.1
- Nitisinprasert, S., N. Pungsungworn, P. Wanchaitanawong, G. Loiseau, & D. Montet. 2006. In vitro adhesion assay of lactic acid bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. By microbiological and PCR methods. Songklanakarin. *J. Sci Technol*
- Nuraida, L., Susanti., N.S. Palupi., Hana., R.R. Bastomi., D. Priscilia and S. Nurjanah. 2012. Evaluation of probiotics properties of lactic acid bacteria isolated from breast milk and their potency as starter culture

for yoghurt fermentation. *Inter. J. Of Food, Nutrition and Public Health*. Vol. 5 No.1-3: 33-60

- Nurwati, L., and Refdinal Nawfa. 2015. Identifikasi Spesies Isolat Bakteri Galur D dengan Metode Analis Sekuen Fragmen Gen 16S rDNA *Jurnal Sains Dan Seni ITS*. Vol. 4. No.2
- Pangastuti, A. 2006. Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16S Rrna dan Gen Penyandi Protein. *Biodiversitas*. 292-296
- Paul, E.A. 2007. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry 3rd Edition*, United States of America: ELSIVIER
- Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. 2009. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry*. Vol.55: 856-866
- Purwati, Endang., James Hellyward, Yuherman, Hendri Purwanto, Puji Hartini R. 2018. Isolation, Characterization And Identification Of Dna's Lactic Acid Bacteria (Lab) Of Dadih Lintau (Tanah Datar District) Which Is Antibiotic Resistance. *International Journal Of Advances In Science Engineering And Technology*. Vol. 6
- Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi*. Vol.3. Departemen Farmasi, FMIPA-UI, *Majalah Ilmu Lefarmasian*, Desember
- Ragil, Dyah & Dyah Yunita. 2017. Hubungan Antara Pengetahuan Dan Kebiasaan Mencuci Tangan Pengasuh Dengan Kejadian Diare Pada Balita. *Jurnal of Health Education*. Vol.1
- Rahayu ES. 2001. Potensi dan Peranan Prebiotik Dalam Makanan Sehat. *Seminar Prebiotik, Probiotik dan Makanan Sehat*. Fakultas Biologi Universitas Atmajaya Yogyakarta
- Randazzo, Cinzia L. Sandra Torriani, Antoon D. L. Akkermans, Willem M. de Vos, and Elaine E. Vaughan. 2002. Diversity, Dynamics, and Activity of Bacterial Communities during Production of an Artisanal Sicilian Cheese as Evaluated by 16S rRNA Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68
- Rinanda, Tristia. 2011. Analisis Sekuensing 16S Rrna Di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*. Vol. 11 No. 3

- Rohdiana, Dadan,. Dede Zainal Arief, Arista Budiman, 2013. Aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* oleh berbagai jenis teh dan seduhannya. *Jurnal Penelitian Teh dan Kina*. Vol. 16 No. 1 37-44
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning Laboratory Manual 3rd Ed*. Cold Spring Harbour Lab. Press:New York
- Salminen Arthur C. Ouwehand Seppo., Sampo Lahtinen, Atte Von Wright. 1998. *Lactid Acid Bacteria*. New York: Marcell Dekker Inc
- Salminen S., Ouwehand, A., Benno, Y. & Lee Y.K.1999. *Probiotics: how should be defined? Trends in Food Science and Technology* Vol. 10: 107 – 110
- Sanz, Y., Collado, M. C., E. Isolauri, S. Salmien, 2007. The impact of probiotic on gut health. *Curr Drug Metab*. Vol.10. No.1: 68-78
- Sari, Meisji Liana, Arfan Abrar, Merint Merint. 2013. Isolasi dan Karakter Bakteri Asam Laktat pada Usus Ayam Broiler. *Agripet*. Vol.13 No.1: 43-48
- Scherezemmer, J. and M. verse. 2001. Probiotics, Prebiotics, And Synbiotics- Approaching A Definition. *Am J.Clin. nutr*.Vol.73: 361-364
- Setiarto, R. Haryo Bimo,. Nunuk Widhyastuti, Iwan Saskiawan, dan Rina Marita Safitri 2017. Pengaruh Variasi Konsentrasi Inulin Pada Proses Fermentasi Oleh *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus hermophiles*. *Biopropal Industri* Vol.8 No.1
- Setiawan B, 2006, *Diare akut karena infeksi*, Dalam: Sudoyo A, Setyohadi B, Alwi I et al., *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid 3 Ed IV*, Departemen IPD FK UI, Jakarta
- Sharma, A.K., P.Mohan, and B.B Nayak. 2005. Probiotic: Making a comeback. *Indian J. Pharmacol*. Vol.37: 358-365
- Shihab, M. Quraish. 2003. *Tafsir al-Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati
- Shinta K. 2011. Pengaruh probiotik pada diare akut:Penelitian dengan 3 preparat probiotik. *Sari Pediatri*. Vol.13 No.2: 89-95
- Simadibrata, MK. 2006. Pendekatan Diagnostik Diare Kronik. Di dalam: Sudoyo Aru w et al, editor. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jilid I Edisi IV. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK UI

- Sunaryanto, Rofiq., Efrida Martius, Bambang Marwoto. 2014. Uji Kemampuan *Lactobacillus casei* Sebagai Agensia Probiotik. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*. Vol. 1 No. 1
- Supriatna Iman., Intannurfemi B. Hismayasari, I Gusti Ayu Bidiadnyani, Moh. Sayuti, Ahmad Yani. 2016. Analisis Karakteristik Bakteri Probiotik. *Jurnal Airaha*. Vol 5 No. 2
- Thapar, N. & Sanderson, I., 2004. Diarrhea in children: an interface between developing and developed countries. *The Lancet*. Vol. 363: 641
- Tannock GW. 1999. Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues Molec Biol* Vol.1: 53-64
- Timmins, M.J., and L.J.H., Ward. 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* by Polymerase Chain Reaction. *Letters in Applied Microbiology*. Vol.29: 90-92
- Utami, Nurul and Nabila Luthfiana. 2016. Faktor-Faktor yang Memengaruhi Kejadian Diare pada Anak. *Majority*. Vol. 5 No.4
- Vaughnan, E.E., H.G.H Heilig, E.G. Zoetendal, R. Satokari, J.K. Collins, A.D.L. Akkermans, and W.M. de Vos. 1999. Molecular Approaches to Study Probiotic Bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* Vol.10: 400-404
- Vila J, Vargas M, Ruiz J, Corachan M, De Anta MTJ, Gascon J. 2002. Quinolone Resisten in Enterotoxigenic E.coli causing Diarrhea in Travelers to India in Comparison with other Geographical Areas. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*
- Wahyuningsih, Retno., Darmono SS, Ani Margawati. 2014. Pengaruh Pemberian Probiotik *Lactobacillus rhamnosus* Rosell-11 terhadap kadar limfosit lanjut usia . *Jurnal Gizi Indonesia*. Vol. 3 No. 1
- Widjaja, 2002. *Mengatasi Diare dan Keracunan pada Balita*. Jakarta : Kawan Pustaka
- Widodo, Taufiq TT., Aryati1 E., Kurniawati A. & Asmara W. 2012. Human Origin *Lactobacillus casei* Isolated from Indonesian Infants Demonstrating Potential Characteristics as Probiotics in vitro. *Indonesian Journal of Biotechnology*. Vol.17: 79-89

- Widodo, Anindita NS., Taufiq TT., Aditya S. & Wahyuningsih TD. 2014. Evaluation of Two *Lactobacillus* Strains as Probiotics with Emphasis in Utilizing Prebiotic Inulin as Energy Source. *Int. Res. J. Microbiol.* Vol.5: 33-40
- Widodo. 2017. *Bakteri Asam Laktat Strain Lokal*. Yogyakarta: UGM Press
- Widowati, S., Titi, C.S., Zahrani. 2005. Ekstraksi, Karakterisasi, dan Kajian Potensi Prebiotik Inulin dari Umbi Dahlia (*Dahlia pinnata* L.). *Jurnal IPB Bogor*
- Winarsih, Priosoeryanto, Lay, Wibawan & Kompiang. 2007. Pengaruh Probiotik terhadap Fagositosis Polimorfonuklear. *J. Med.Vet. Indones.* Vol.11: 37-43
- Yonata, Ade., Agus Fathul Muin Farid. 2016. Penggunaan Probiotik sebagai Terapi Diare .*Majority*. Vol. 5 No. 2
- Zubaidah, Elok., Christine Natalia Halim. 2013. Studi Kemampuan Probiotik Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Tinggi Asal Sawi Asin (*Brassica juncea*) *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol. 1 No.1:129-137

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan media LBS

1. Pembuatan media padat (LBS Agar)

Untuk membuat 250 mL media LBS Agar diperlukan:

Nama Bahan	Jumlah (g)
Casein	2.5
Yeast	1.25
Glukosa	5
Sodium asetat	6.25
K ₂ HPO ₄	1.5
Amonium sitrat	0.5
Polysorbate 80	250 µl
Asam asetat glasial	330 µl
MgSO ₄	0.14375
MnSO ₄	0.03
Ferrous sulfat	0.0085
Agar	3.75

2. Pembuatan media cair (LBS Broth)

Untuk membuat 250 mL media LBS Broth diperlukan:

Nama Bahan	Jumlah (g)
Casein	2.5
Yeast	1.25
Glukosa	5
Sodium asetat	6.25
K ₂ HPO ₄	1.5
Amonium sitrat	0.5
Polysorbate 80	250 µl
Asam asetat glasial	330 µl
MgSO ₄	0.14375
MnSO ₄	0.03
Ferrous sulfat	0.0085

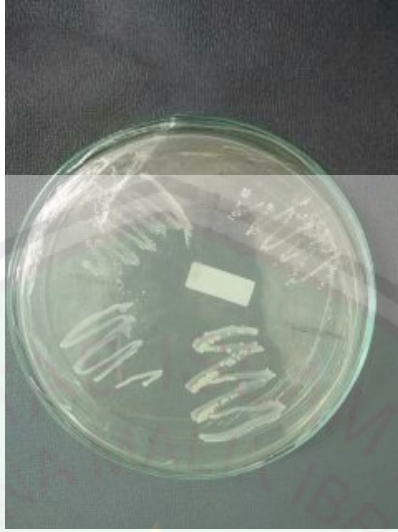
Lampiran 2. Dokumentasi Media dan Koloni



(Media LBS Broth)



(Media LBS Agar)



(Koloni bakteri yang di isolasi)

Lampiran 3. Sekuen L.casei strain NWAFU1554 dan sekuen isolat L—1

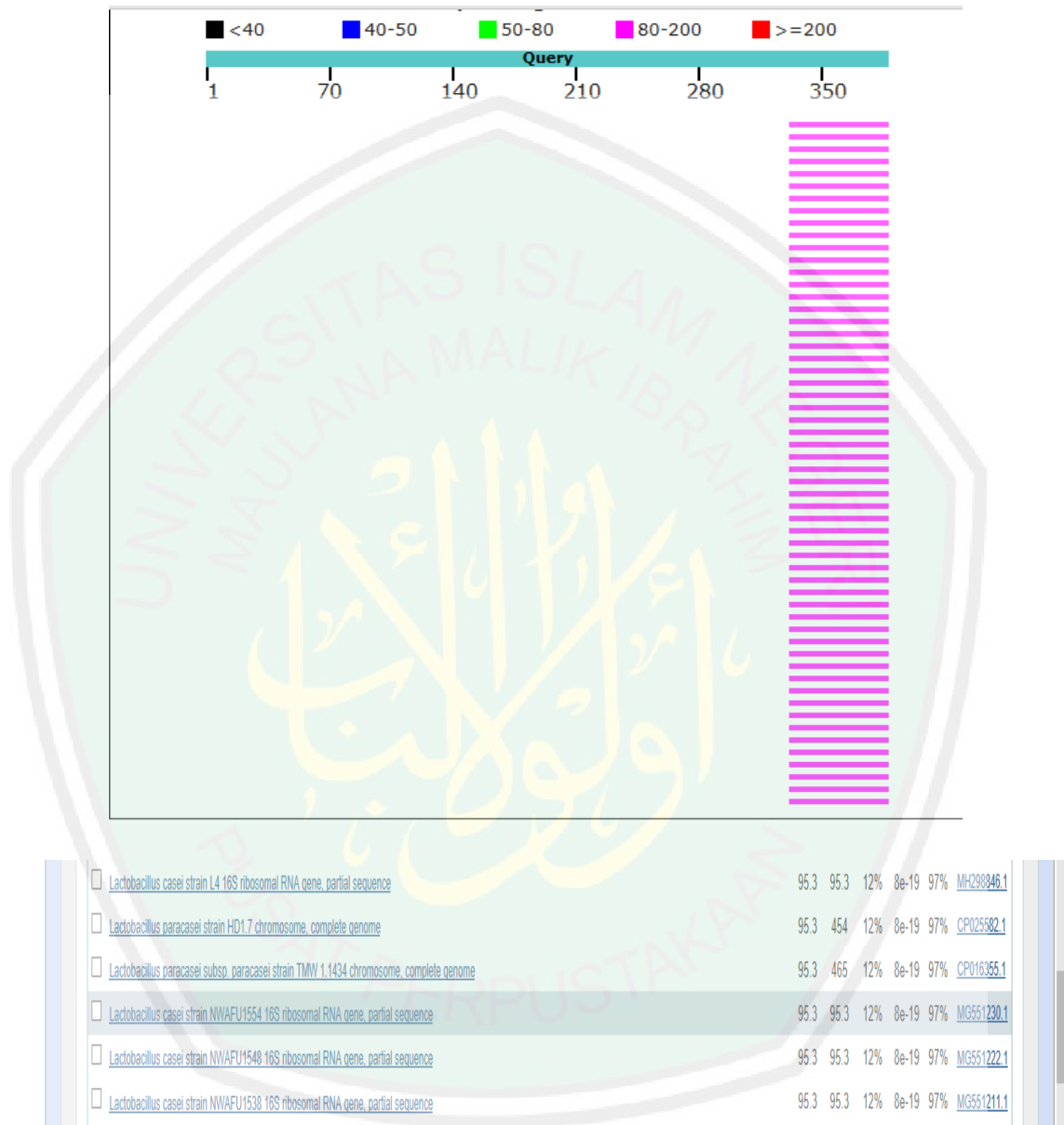
1. Sekuen L.casei strain NWAFU1554

1 caatgggggg ggtggcctat acatgcagtc gaacgagttc tcgttgatga
 tcggtgcttg 61
 caccgagatt caacatggaa cgagtggcgg acgggtgagt aacacgtggg
 taacctgccc 121
 ttaagtgggg gataacattht ggaaacagat gctaataccg catagatcca
 agaaccgcat 181
 ggttcttggc tgaaagatgg cgtaagctat cgcttttgga tggacccgcg
 gcgtattagc 241
 tagttggtga ggtaatggct caccaaggcg atgatacgta gccgaactga
 gaggttgatc 301
 ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctccctacggg aggcagcagt
 agggaatctt 361
 ccacaatgga cgcaagtctg atggagcaac gccgcgtgag tgaagaaggc
 tttcgggtcg 421
 taaaactctg ttgttggaaga agaattggctg gcagagtaac tgttgccggc
 gtgacgggtat 481
 ccaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt
 aggtggcaag 541
 cgttatccgg atttattggg cgtaaagcga gcgcaggcgg ttttttaagt
 ctgatgtgaa 601
 agccctcggc ttaaccgagg aagcgcacgc gaaactggga aacttgagtg
 cagaagagga 661
 cagtggaact ccatgtgtag cggtgaaatg cgtagatata tggaagaaca
 ccagtggcga 721
 agggcgctgt ctggctctga actgacgctg aggcctcga aa gcatgggtag
 cgaacaggat 781
 tagataccct ggtagtccat gccgtaaacg atgaatgcta ggtgttgagg
 ggtttccgcc 841
 cttcagtgcc gcagctaacg cattaagcat tccgcctggg gagtacgacc
 gcaaggttga 901
 aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcgggtggag catgtggttt
 aattcgaagc 961
 aacgcgaaga accttaccag gtcttgacat cttttgatca cctgagagat
 caggtttccc 1021
 cttcgggggc aaaatgacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg
 tgagatgttg 1081
 ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta tgactagtth ccagcattta
 gttgggcact 1141
 ctagtgaagac tgccgggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaaa
 tcatcatgcc 1201
 ccttatgacc tgggctacac acgtgctaca atggatggta caacgagttg
 cgagaccgcg 1261
 aggtcaagct aatctcttaa agccattctc agttcggact gtaggctgca
 actcgcctac 1321
 acgaagtcgg aatcgctagt aatcgcgat cagcacgccg cggatgaatac
 gttcccgggc 1381
 cttgtacaca ccgcccgtca caccatgaga gtttgtaaca cccgaagccg
 gtggcgtaac 1441
 cctttaggga gcgagccgtt cttaaggggg aaccaaattt ggg

2. Sekuen Isolat L-1

1 GGGAAAATCT TTTTAAAGTA AGCCCAAATA AATTTAGTAC AAATTATCTG
GAGTGGAAAG 61
TAATAATTTT CTTGGGTGCT TTGTGTTTTT AAAATATTGT TTAAAAAGAC
AAAATATTCC 121
TACCATAGCT TGAAAGTTCT TTGATTCTTG GGTAAATATA TCTTTTGAAA
AGGACGCAGG 181
TTCGAGACGC TTCAACGATT TTTTTTTGAA ACTCAAAATT TCCATTTAAA
AAAGGTACTC 241
CCTTTTCTAC TTGGAAAAGT GGGTTGACAG AGGTTTTTTT ATTGGATTTC
TCGTGAAGGT 301
CCCGTGCTCG TATTGGTGCT AACGCCCTTC TCCCTCACTT CCCGATAAGT
TGGGGGAAGG 361
GGGCAGACAT TGGGCCTGTG TCCATAATTT TGGCCGTAAA ACTCGTTGTT
GGAGAAGAAT 401
GGTCGGCAGA GTAACGTGTG CCGGCGTG

Lampiran 4. Hasil BLAST





**KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI**

Jalan Gajayana No. 50 Malang 65144
Telepon 551354/ Faksimile (0341) 572533
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id>
Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Arina Khusnah
NIM : 14620021
Program : S1 Biologi
Semester : Genap TA 2018/2019
Pembimbing : Nur Kusmiyati, M.Si
Judul Skripsi : Deteksi Molekuler *Lactobacillus* spp. pada Mencit Diare Pasca
Pemberian Sinbiotik Menggunakan 16S rRNA

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd Pembimbing
1	15 Maret 2018	Bab I	
2	28 Maret 2018	Revisi Bab I	
3	2 April 2018	Bab II	
4	17 April 2018	Revisi Bab II	
5	22 Juli 2018	Acc Bab I dan II	
6	27 Juli 2018	Bab III	
7	16 Agustus 2018	Revisi Bab III	
8	20 Agustus 2018	Acc Bab III	
9	21 Mei 2019	Bab IV dan V	
10	24 Mei 2019	Revisi Bab IV dan V	

Pembimbing Skripsi

Nur Kusmiyati, M.Si
NIDT. 19890816 20160801 2 061



Malang, 14 Juni 2019
Ketua Jurusan

Romaidi, M.Si, D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019



**KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI**

Jalan Gajayana No. 50 Malang 65144
Telepon 551354/ Faksimile (0341) 572533
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id>
Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI INTEGRASI ISLAM DAN SAINS

Nama : Arina Khusnah
NIM : 14620021
Program : S1 Biologi
Semester : Genap TA 2018/2019
Pembimbing : Mujahidin Ahmad, M.Sc
Judul Skripsi : Deteksi Molekuler *Lactobacillus* spp. Pada Mencit Diare Pasca Pemberian Sinbiotik Menggunakan 16S rRNA

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd Pembimbing
1	14 September 2018	Bab I-II	
2	19 September 2018	Revisi Bab I-II	
3	21 September 2018	Acc Bab I-II	
4	13 Mei 2019	Bab IV	
5	24 Mei 2019	Acc Bab IV	

Pembimbing Skripsi

Mujahidin Ahmad, M.Sc
NIDT.19860512 20160801 1060

Malang, 14 Juni 2019
Ketua Jurusan



Romaidi M.Si.D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 01

