

Pengkulturan Sampel Susu Fermentasi yang Mengandung Probiotik dan Identifikasinya dengan PCR

(Culturation of Fermented Milk Samples Containing Probiotic and Its Identification by PCR)

AMARILA MALIK*, INDRIANI, LILIANA SARAGIH, MAKSUM RADJI

Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi,
Departemen Farmasi, FMIPA Universitas Indonesia, Kampus UI Depok - Depok 16424

Diterima 17 Januari 2011, Disetujui 9 Maret 2011

Abstrak: Bakteri Asam Laktat (BAL) telah lama digunakan dalam fermentasi susu karena sifatnya yang stabil, memberikan rasa dan tekstur yang unik, serta berkat manfaat probiotiknya bagi kesehatan. Kini telah banyak produk-produk susu fermentasi yang beredar di pasaran yang menyatakan kandungan kultur hidup atau sebagai probiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi BAL dari produk-produk susu fermentasi dengan pengamatan visual kultur secara morfologi pada cawan, dan pula dengan teknik molekular dengan cara PCR dan sekuensing DNA. Morfologi dan waktu inkubasi pertumbuhan setiap isolat diamati. Untuk identifikasi dengan PCR di dalam penelitian ini digunakan sepasang primer yang kespesifikannya tinggi terhadap BAL yang mentarget gen penyandi rRNA 16S yang mewakili sekuens di daerah 677 hingga 693 dari penomoran *E. coli*. Sebanyak 19 isolat berhasil diperoleh dari pertumbuhan pada medium agar *de Mann Rogosa Sharpe* (MRS) dari 10 sampel susu fermentasi. Sembilan dari 19 isolat tersebut yang mewakili setiap sampel dipilih, kemudian dilakukan ekstraksi DNA genomik. Kesembilan DNA genomik tersebut digunakan sebagai cetakan untuk PCR. Hasil menunjukkan bahwa 8 amplikon positif teridentifikasi sebagai BAL, namun hanya tiga identitas yang sesuai dengan spesies yang dinyatakan, sedangkan sebanyak 5 isolat lagi tidak sesuai.

Kata kunci: bakteri asam laktat, susu fermentasi, probiotik, identifikasi molekul, PCR, 16S rRNA.

Abstract: Lactic Acid Bacteria (LAB) has long been used in fermented milk because its stability, unique taste and texture and also for its health benefits that are provided by the probiotic. There are many fermented dairy products in the market nowadays that declared containing living culture or as probiotics. The aim of this study was to identify LAB from fermented milk product by visual inspection on plate culture for their morphology, as well by molecular technique performing PCR and DNA sequencing methods. Morphology and growth incubation time of each isolate was observed. A pair of primer that is highly specific for LAB targeting the gene encoding for 16S rRNA, which represents sequences of region 677 to 693 of *E. coli* numbering has been used for PCR identification in this study. A total of nineteen isolates were obtained from 10 fermented milk samples that were grown on *de Mann Rogosa Sharpe Agar* (MRS) media. Nine out of 19 isolates which represent each of the samples were selected. Genomic DNA extracted from those 9 isolates were used as template for PCR. The results showed that 8 amplicons were positively identified as LAB, but only three identities indicated similar species as declared, while 5 others did not.

Keywords: lactic acid bacteria, fermented milk, probiotic, molecular identification, PCR, 16S rRNA.

PENDAHULUAN

MINUMAN fermentasi yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL) sebagian besar berasal dari susu.

* Penulis korespondensi, Hp. 0816751775
e-mail: amarila.malik@gmail.com

Bakteri asam laktat banyak digunakan dalam fermentasi makanan dan minuman karena produk-produk yang dihasilkan terjamin dalam hal keamanan stabilitas selama penyimpanan dan juga karena tekstur dan rasa yang khas⁽¹⁾.

Produk-produk minuman susu fermentasi yang

dihasilkan oleh BAL diantaranya yaitu yoghurt, kefir, labneh, dahi, rahmjoghurt, dadiah dan banyak macam produk susu fermentasi lainnya. Susu fermentasi dibuat dengan menambahkan BAL ke dalam susu yang dipasteurisasi pada suhu dan kondisi lingkungan yang dikontrol. BAL akan mengolah gula susu alami menjadi asam laktat. Hal itu akan meningkatkan keasaman dan menyebabkan protein susu terkoagulasi menjadi massa yang padat atau kental. Peningkatan keasaman mencapai pH 4 sampai dengan 5 juga mencegah proliferasi dari bakteri patogen lainnya. Umumnya kultur BAL yang digunakan untuk membuat susu fermentasi melibatkan dua atau lebih bakteri yang berbeda untuk proses fermentasi, biasanya yaitu dari genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*^(2,3).

Selain berguna untuk fermentasi dan pengawetan, BAL dalam susu fermentasi juga berfungsi sebagai probiotik. Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang terdapat pada saluran cerna manusia dan hewan yang memiliki manfaat terapeutik maupun profilaksis, serta dilaporkan mampu mencegah infeksi saluran cerna^(2,3). Probiotik bekerja dengan cara membantu menurunkan derajat keasaman dan menghambat pertumbuhan organisme pengganggu dalam sistem pencernaan. Koloni BAL pada permukaan lapisan mukus usus dapat meningkatkan kekebalan sistem imun tubuh dan dapat menyeimbangkan jumlah normal flora usus. Mengonsumsi produk fermentasi yang mengandung probiotik telah terbukti sangat bermanfaat pada kesehatan manusia. Diantara manfaat probiotik adalah kemampuannya dalam meningkatkan kekebalan tubuh, membantu menyembuhkan infeksi saluran cerna, menurunkan infeksi jamur, membantu proses penyerapan nutrisi, mudah dicerna, menurunkan kadar kolesterol, dan banyak manfaat lainnya^(2,3,4).

Saat ini telah banyak tersedia berbagai macam merek minuman susu fermentasi, terutama yoghurt, baik diproduksi oleh perusahaan berskala internasional sampai yang diproduksi oleh industri lokal. Hampir semua produsen susu fermentasi tersebut menyatakan bahwa produk mereka mengandung kultur probiotik tertentu. Guna memastikan bahwa produk susu fermentasi yang berada di pasaran mengandung kultur hidup probiotik dari BAL dan untuk mengonfirmasi identitas BAL yang terkandung dalam susu fermentasi tersebut, dilakukan penelitian ini dengan cara mengkultur berbagai sampel minuman susu fermentasi yang mengandung kultur hidup probiotik, kemudian mengidentifikasi secara molekular dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dan sekuensing DNA. Pada spesies BAL, identifikasi dengan teknik konvensional lebih sulit dilakukan karena kedekatan fenotipik antara spesies yang satu dengan lainnya. Namun, adakalanya identifikasi konvensional digunakan

sebagai identifikasi pendahuluan sebelum melakukan identifikasi molekular^(5,6).

Polymerase chain reaction merupakan suatu teknik yang cepat, sederhana namun adekuat untuk mengamplifikasi sejumlah kecil sekuens DNA spesifik menjadi berjuta kali lebih banyak hanya dalam waktu beberapa jam. Identifikasi dilakukan dengan analisis sekuens DNA dari ribosomal 16S yang spesifik pada organisme prokariot^(5,6).

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Sampel susu fermentasi. Sampel yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari 10 sampel minuman susu fermentasi yang beredar di pasaran yang menyatakan mengandung kultur hidup (probiotik) bakteri asam laktat (data nama dagang tidak disebutkan). Sebagian besar merupakan minuman yoghurt yang bertekstur semipadat dan sisanya merupakan minuman susu fermentasi atau susu asam yang berbentuk cair. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium MRS⁽⁷⁾.

METODE. Pengulturan Bakteri Asam Laktat. Semua pengkulturan dilakukan duplo sampai dengan triplo untuk menjamin homogenitas perolehan isolat dari sampel.

Pengenceran Sampel Cair. Sebanyak 5 mL sampel dipipet, dimasukkan ke dalam labu ukur 50.0 mL, dan disuspensi dalam aquades steril hingga batas (pengenceran 10X). Suspensi tersebut kemudian divortex, kemudian diambil sebanyak 0.1 mL dan dituang ke dalam tabung yang berisi 9.9 mL aquades steril (pengenceran 10³X). Selanjutnya dibuat pengenceran 10⁴X dan 10⁶X. Sebanyak masing-masing 0.2 mL sampel hasil pengenceran 10³X, 10⁴X, dan 10⁶X disebar di cawan petri medium agar MRS, kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam atau sampai ada pertumbuhan dengan waktu maksimum 3 hari.

Pengenceran Sampel Setengah Padat. Sebanyak 5 g sampel ditimbang di dalam botol timbang, dimasukkan ke dalam labu ukur 50.0 mL, dan disuspensi dalam aquades steril hingga batas (pengenceran 10X). Suspensi tersebut divortex, diambil sebanyak 0.1 mL dan dituang dalam tabung yang berisi 9.9 mL aquades steril (pengenceran 10³X). Selanjutnya dilakukan sama dengan pengenceran sampel cair.

Purifikasi isolat⁽⁶⁾. Isolat-isolat yang tumbuh digoreskan ke medium agar MRS dan diinkubasi. Setelah diperoleh koloni tunggal, isolat ditanam kembali pada agar miring yaitu sebagai kultur kerja. Isolat untuk kultur stok beku disimpan dalam gliserol sebagai berikut. Sebanyak 0.75 mL gliserol dan 0.25 mL dapar Tris EDTA (TE) 1X dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus 2.0 mL, kemudian disterilisasi dalam

autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Sejumlah 0.5 mL kultur yang telah diinkubasi dalam medium cair MRS dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus tersebut, divortex hingga homogen, dan disimpan segera pada suhu -70 °C untuk penyimpanan jangka panjang. Untuk mendapatkan kembali isolat yang disimpan tersebut, dapat digores kembali pada medium agar MRS.

Pengamatan visual. Pertumbuhan kultur probiotik pada medium agar diamati secara visual meliputi morfologi koloni, berupa bentuk dan permukaan, serta ukuran dan warna.

Ekstraksi DNA Genomik^(6, 8-10). Ekstraksi DNA Genomik dengan Metode Modifikasi Murray dan Thompson (1980) menggunakan *Cetyltrimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) [Sigma]. Isolat BAL dikultur dalam medium cair MRS, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 30 °C. Setelah itu, kultur disentrifugasi pada suhu 20 °C selama 3 menit, dengan kecepatan 10000 x g. Pelet sel yang diperoleh kemudian disuspensikan kembali ke dalam 557 µL dapar STET, dan selanjutnya dilaksanakan sebagaimana dijabarkan^(6,8-10).

Elektroforesis Gel Agarosa^(6,10). Sejumlah 3 µL ekstrak DNA dengan penambahan *loading buffer* dimuatkan ke dalam sumur gel yang sudah dicetak dan sudah mengandung etidium bromida sebagai agen penampak DNA. Hasil diamati pada UV transiluminator pada panjang gelombang 590 nm sebagaimana dijabarkan.

PCR^(5, 6, 8-10). Campuran untuk analisis dengan PCR adalah sebagai berikut; ke dalam tabung mikrosentrifus 0.5 mL yang baru dan steril ditambahkan air bebas nuklease sebanyak 25 µL, DNA cetakan sebanyak 2 µL, *primer forward* dan *reverse* masing-masing sebanyak 1 µL, yaitu LABFw 5' AGA GTT TGA T(C/T)(A/C) TGG CTC AG 3' dan LABRv 5' CAC CGC TAC ACA TGG AG 3' ⁽⁵⁾. Terakhir ditambahkan sebanyak 21 µL 2X PCR Master MixR [Fermentas], yang terdiri dari dNTP, enzim DNA *Taq polymerase*, reaction buffer dan MgCl₂. Volume akhir yang diperoleh adalah 50 µL. Larutan tersebut disentrifugasi sebentar, kemudian dimasukkan ke dalam alat *thermal cycler*. Kondisi PCR adalah sebagai berikut: pra-siklus pada 95 °C selama 4 menit; dilanjutkan dengan 95 °C selama 30 detik untuk denaturasi; kemudian 55 °C selama 30 detik untuk penempelan; 72 °C selama 1 menit untuk pemanjangan yang dilakukan sebanyak 30 kali siklus; dan diakhiri dengan pasca-siklus pada 72 °C selama 7 menit, serta disimpan pada 4 °C.

Isolasi dan Purifikasi DNA^(6, 10, 11). Amplikon yang diperoleh dilarikan di elektroforesis gel agarosa, kemudian diisolasi dan dipurifikasi dari gel dengan DNA extraction kit menggunakan PCR *Clean UpR Kit* [Geneaid]. Sebanyak 35 µL DNA hasil amplifikasi PCR

dan 5 µL *loading buffer* dielektroforesis di gel agarosa 1% dengan penanda molekuler 1 kb *plus DNA LadderR* [Invitrogen]. Pita-pita dengan ukuran lebih kurang 700 pb dipotong dengan menggunakan *cutter*, kemudian dilakukan sesuai penuntun kerja dari Geneaid⁽¹¹⁾.

Analisis hasil sekuensing DNA^(6, 10). DNA murni yang diperoleh diamati lagi dengan elektroforesis gel agarosa, kemudian dikirim ke Laboratorium Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIP) di Cibinong untuk disekuensing. Hasil sekuensing DNA dianalisa dengan membandingkan terhadap sekuens yang terdapat pada GenBank dengan program BLAST⁽¹²⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat BAL dan pengamatan visual. Dari 10 sampel yang diisolasi diperoleh sebanyak 19 isolat. Dari sampel I diperoleh 2 isolat, sampel II diperoleh 3 isolat, sampel III diperoleh 1 isolat, sampel V diperoleh 3 isolat, sampel VI diperoleh 3 isolat, sampel VII diperoleh 3 isolat, sampel VIII diperoleh 1 isolat, sampel IX diperoleh 1 isolat, sampel X diperoleh 2 isolat dan sampel IV tidak diperoleh isolat sama sekali, sebagaimana disajikan pada Tabel 1.

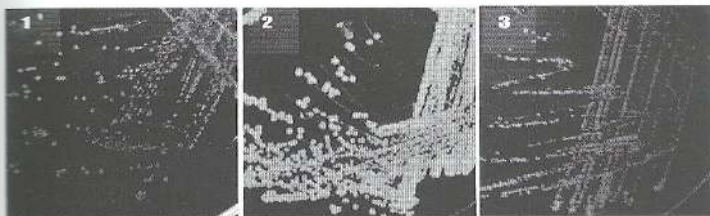
Pertumbuhan koloni BAL ternyata tidak berhasil diperoleh dari beberapa sampel susu fermentasi yang diuji. Hal ini kemungkinan disebabkan sampel yang digunakan telah mendekati masa kadaluarsanya atau kultur BAL yang dikandung sampel tersebut sebenarnya sudah mati. Akibat kondisi penyimpanan maupun pada saat distribusi yang tidak memenuhi persyaratan. Beberapa BAL yang dinyatakan terdapat di dalam sediaan uji juga tidak berhasil dikultur. Penyebab hal tersebut kemungkinan adalah karena kondisi dan medium pertumbuhan yang kurang optimum bagi beberapa spesies BAL, serta kemungkinan yang telah disebutkan sebelumnya yaitu bahwa spesies tersebut sudah mati pada saat pengisolasian sampel.

Hasil pengamatan visual berupa morfologi isolat adalah kebanyakan isolat membentuk koloni dengan permukaan halus dan berwarna putih sampai putih kekuningan. Koloni yang berhasil tumbuh tersebut kemudian dipindahkan dan digoreskan pada medium agar MRS untuk pengenceran koloni dengan tujuan memperoleh koloni yang benar-benar tunggal. Jika dalam satu medium terdapat koloni yang berbeda bentuk dan warnanya, maka semua koloni tersebut digoreskan pada medium yang terpisah. Ukuran koloni ada yang sangat kecil dan ada yang relatif lebih besar, sebagaimana disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Hasil ekstraksi dan amplifikasi DNA. Sebanyak 9 isolat dari 19 isolat bakteri dipilih untuk diekstraksi DNA genomiknya. Pemilihan dilakukan berdasarkan

Tabel 1. Isolat bakteri asam laktat dan hasil pengamatan visual berdasarkan morfologi.

Nama Isolat	Sumber	Warna	Morfologi Koloni Bakteri		Periode Tumbuh
			Permukaan	Bentuk	
S.I.A	Sampel I	putih	halus	kecil	3 hari
S.I.B	Sampel I	putih	halus	kecil	3 hari
S.II.A	Sampel II	putih	halus	kecil	3 hari
S.II.B	Sampel II	putih	halus	kecil	3 hari
S.II.C	Sampel II	putih	halus	kecil	3 hari
S.III.A	Sampel III	putih	halus	kecil	2 hari
S.V.A	Sampel V	putih kekuningan	halus	besar	1 hari
S.V.B	Sampel V	putih kekuningan	halus	sedang	1 hari
S.V.D	Sampel V	putih	halus	kecil	1 hari
S.VI.A	Sampel VI	putih kekuningan	halus	besar	1 hari
S.VI.B	Sampel VI	putih kekuningan	halus	sedang	1 hari
S.VI.D	Sampel VI	putih	halus	kecil	1 hari
S.VII.A	Sampel VII	putih kekuningan	halus	besar	1 hari
S.VII.D	Sampel VII	putih	halus	kecil	1 hari
S.VII.E	Sampel VII	putih	halus	kecil	1 hari
S.VIII.A	Sampel VIII	putih	halus	kecil	2 hari
S.IX.C	Sampel IX	putih	halus	kecil	1 hari
S.X.A	Sampel X	putih	halus	kecil	2 hari
S.X.B	Sampel X	putih	halus	kecil	2 hari



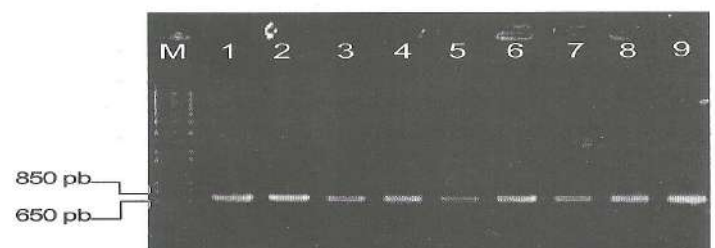
Gambar 1. Koloni bakteri hasil pengenceran isolat pada medium agar MRS. 1. S.II.A; 2. S.VI.A; 3. S.IX.C.

dugaan bahwa isolat tersebut sama maupun berbeda satu dengan yang lain sesuai pernyataan yang tertera pada kemasan sampel. Sekuens primer oligonukleotida yang telah digunakan oleh para peneliti untuk identifikasi kelompok BAL dilaporkan telah berhasil mengidentifikasi dengan spesifik genus-genus BAL dan dapat diperoleh identitas yang akurat^(5, 6, 8-10). Sekuens primer yang dijadikan sebagai target dari primer yang digunakan tersebut sesuai dengan daerah penomoran 677-693 pada gen 16S rRNA *Escherichia coli*⁽⁵⁾.

Kesembilan ekstrak DNA tersebut diamplifikasi dengan PCR dan menunjukkan hasil positif dengan ukuran amplicon lebih kurang 700 pasang basa (pb)

sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil sekuens DNA untuk identitas. Dari 9 amplicon, yang berhasil diidentifikasi dengan teknik sekuensing adalah sejumlah 8 amplicon. Hasil perbandingan sekuens DNA tersebut menunjukkan bahwa isolat-isolat yang diperoleh adalah *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, dan *Staphylococcus hominis* dengan homologi sekitar 77%-98% yang disajikan pada Tabel 2.



Gambar 2. Hasil identifikasi Bakteri Asam Laktat berdasarkan gen penyandi RNA ribosomal 16S menunjukkan amplicon sekitar 700 pb. M. 1 kb Plus DNA Ladder; 1. S.I.B; 2. S.II.A; 3. S.III.A; 4. S.V.D; 5. S.VI.A; 6. S.VII.D; 7. S.VIII.A; 8. S.IX.C; 9. S.X.A.

Tabel 2. Perbandingan kandungan BAL yang dinyatakan dalam sampel dan hasil identifikasi.

Sampel	Kandungan BAL	Hasil Identifikasi
Sampel I	<i>Lactobacillus casei shirota strain</i>	<i>Lactobacillus casei</i> 97%
Sampel II	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacteria</i>	<i>Lactobacillus casei</i> 95%
Sampel III	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 80%
Sampel IV	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	-
Sampel V	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacteria</i>	-
Sampel VI	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 95%
Sampel VII	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 98%
Sampel VIII	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacteria</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 96%
Sampel IX	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacteria</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> 77%
Sampel X	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacteria</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 95%

Persentasi homologi tersebut berkaitan dengan adanya variasi genetik dalam kelompok BAL.

Isolat yang berasal dari sampel I yang berhasil diisolasi adalah *Lactobacillus casei*; isolat asal sampel II adalah *Lactobacillus casei*; isolat asal sampel III adalah *Leuconostoc mesenteroides*; isolat asal sampel VI adalah *Leuconostoc mesenteroides*; isolat asal sampel VII adalah *Lactobacillus acidophilus*; isolat asal sampel VIII adalah *Leuconostoc mesenteroides*; isolat asal sampel IX adalah *Staphylococcus hominis*; isolat asal sampel X adalah *Leuconostoc mesenteroides*.

Hasil identifikasi sampel IX yaitu *Staphylococcus hominis* memiliki kehomologian terendah yaitu 77%. Hasil ini kurang dapat dipastikan karena tidak memenuhi syarat kehomologian di atas 95%. Sementara, hasil yang sudah memenuhi syarat di atas 95% namun berbeda dengan pernyataan di label produk, kemungkinan disebabkan oleh kurang spesifiknya primer yang digunakan dalam proses PCR untuk mengidentifikasi spesies pada isolat tersebut⁽¹³⁾. Oleh karena itu, untuk mengidentifikasi spesies BAL lain dapat digunakan primer lain sebagai kontrol pengecekan-silang sebagaimana dilaporkan^(14, 15).

Jika dibandingkan dengan metode konvensional yang hanya dapat mengidentifikasi BAL dengan menggunakan ciri-ciri visual berupa morfologi, atau dengan mikroskop maupun dengan tes biokimia dan kimiawi, identifikasi molekular memiliki keunggulan karena dapat secara akurat mengidentifikasi sampai ke tingkat spesies dengan menggunakan pendekatan

analisis genotipik^(14, 15). Analisis genotipik berkaitan dengan genotipe suatu organism. Genotipe yaitu sifat konstitusi genetik suatu organisme yang tetap. Sementara fenotipe merupakan sifat yang dapat teramati yang merupakan ekspresi dari genotipenya⁽¹⁶⁾.

Dari hasil yang diperoleh, terdapat hanya 3 sampel yang berhasil menunjukkan identitas BAL sesuai dengan yang dinyatakan oleh produsen masing-masing dan terdapat 5 sampel yang kandungan spesies BALnya berbeda dari yang dinyatakan oleh produsennya atau terdapat spesies BAL lain disamping spesies BAL yang dinyatakan oleh produsen tersebut. Hasil ini perlu dievaluasi lebih lanjut jika ingin memastikan metode identifikasi probiotik dengan PCR, yaitu dengan penggunaan primer lain yang dapat diandalkan sebagai data penunjang bagi hasil yang pertama.

SIMPULAN

Penelitian ini dilakukan untuk memeriksa sampel susu fermentasi yang beredar di pasaran mengandung kultur hidup (probiotik) bakteri asam laktat (BAL) sesuai yang dinyatakan oleh produsen produk-produk susu fermentasi tersebut. Metode yang digunakan untuk mengidentifikasi BAL yang dikandung oleh sampel adalah metode identifikasi sampai ke tingkat molekular dengan cara membandingkan susunan atau sekuens basa DNA bakteri sampel dengan sekuens yang terdapat pada GenBank. Metode PCR untuk identifikasi kultur probiotik dapat digunakan setelah dilakukan

pengulturan dari sampel susu fermentasi, namun masih perlu dikembangkan metode PCR terutama primer yang digunakan agar diperoleh hasil yang akurat dan dapat dipercaya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Savadogo A, Ouattara CAT, Savadogo PW, Barro N, Ouattara AS, Traore AS. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *African J Biotechnol.* 2004. 3(3):189-94.
2. Anonim. An introduction to probiotics. diambil dari: URL: <http://nccam.nih.gov/health/probiotics/introduction.htm>. diakses 07 Maret 2011, pk. 20.40.
3. Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim H-Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol.* 2006. 100:1171-85.
4. Ljungh A, Wadstrom T. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2006. 7(2):73-89
5. Heilig HGHJ, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans ADL, de Vos WM. Molecular diversity of *Lactobacillus sp.* and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol.* 2002. 68:114-23.
6. Malik A, Felicia, Radji M, Oetari A. Identifikasi bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida asal sumber lokal menggunakan gen penyandi 16S rRNA. *Sains Indones.* 2007. 12(2):1-6
7. De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *J Appl Bacteriol.* 1960. 23:130-5
8. Malik A, Ariestanti DM, Nurfachtiyani A, Yanuar A. Skrining gen glukosiltransferase (gtf) dari bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida. *Makara (Seri Sains).* 2008. 12:1-6.
9. Malik A, Radji M, Kralj S, Dijkhuizen L. Screening of lactic acid bacteria from Indonesia reveals glucansucrase and fructansucrase genes in two different *Weissella confusa* strains from soya. *FEMS Microbiol Lett.* 2009. 300:131-8.
10. Malik A, Hermawati AK, Hestiningtyas M, Soemiati A, Radji M. Isolasi dan skrining molekuler bakteri asam laktat pembawa gen glukansukrase dari makanan dan minuman mengandung gula. *Makara (Sains).* 2010. 14:57-62.
11. Geneaid. Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit. October, 2002.
12. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990. 215(3):403-10.
13. Weaver RF. *Molecular biology.* 3rd Edition. New York: McGraw Hill; 2005. 99-106
14. Mahenthiralingam E, Marchbank A, Drevineck P, Garaiova I, Plummer S. Use of colony-based bacterial strain typing for tracking the fate of *Lactobacillus* strains during human consumption. *BMC Microbiol.* 2009. (9):251-65.
15. Randazzo CL, Torriani S, Akkermans ADL, Vos WM de, Vaughan EE. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2002. 68(4):1882-92.
16. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*, 5th, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group. G:15 & G: 28.