

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Landasan Teori

2.1.1 Probiotik

Organisasi Pangan dan Pertanian dan Organisasi Kesehatan Dunia menggambarkan probiotik sebagai mikroba hidup jika diberikan dalam jumlah yang cukup dapat memberikan manfaat kesehatan pada organisme inang (Munir *et al.*, 2022). Bakteri yang dianggap sebagai mikroba potensial sebagai kandidat probiotik diantaranya genus *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Propionbacterium*, dan *Bacillus* (de Brito-Alves *et al.*, 2016; Hamad *et al.*, 2022). Peran probiotik didalam pencernaan ialah mencegah bakteri patogen dengan membatasi situs pengikatan pada sel epitel mukosa dan memodulasi respons imun inang (Fusco *et al.*, 2023).

Menurut Utami *et al.*, (2015) dan Rahayu *et al.*, (2016) syarat isolat dikatakan sebagai kandidat probiotik, diantaranya adalah tidak bersifat patogen dan dapat menjadi flora normal pada usus inang, serta dapat bertahan dalam keadaan asam lambung dan konsentrasi garam empedu yang tinggi dalam usus halus, dapat tumbuh dan bermetabolisme secara cepat di dalam usus halus, dapat mengkolonisasi di beberapa daerah saluran usus inangnya, memiliki sifat antimikroba terhadap bakteri patogen dan memproduksi asam-asam organik secara efisien, dan mudah diproduksi dalam skala besar serta hidup dalam kondisi penyimpanan.

Manfaat kesehatan yang dirasakan ketika mengonsumsi suplemen probiotik, diantaranya probiotik sebagai anti alergi, seperti yang dijelaskan oleh Harata *et al.*, (2016) bahwa probiotik akan memodulasi respon imunologis dan inflamasi yang akibatnya mempengaruhi perkembangan sensitisasi dan alergi. Probiotik juga dapat mengurangi penyakit saluran pencernaan seperti diare kronis, *Chron's disease* dan *lactose intolerance* (Steed *et al.*, 2010; Pakdamn *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2021). Selain manfaat

kesehatan probiotik juga memberikan manfaat pada industri pangan seperti dalam pembuatan roti dan jus, pada industri susu seperti pembuatan yogurt, kefir, fermentasi kakao, dan pembuatan keju (Lu *et al.*, 2018; Lucatto *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2019).

Saat ini pengembangan agen probiotik telah berinovasi meneliti kandidat isolat lain selain bakteri asam laktat yang sering ditemui sebagai kandidat probiotik, salah satunya ialah isolat khamir. Penulisan mengenai khamir sebagai kandidat probiotik telah banyak dilakukan, seperti penulisan yang dilakukan Muche *et al.*, (2023), yang menunjukkan bahwa isolat khamir dapat bertahan dan tumbuh dalam kondisi stres saluran pencernaan, memiliki sifat antimikroba, dan memproduksi asam organik yang bermanfaat bagi inang.

2.1.2 Dangke

Dangke merupakan makanan tradisional yang berasal dari Kabupaten Enrekang, Sulawesi Selatan (Gambar 2.1). Dangke yang berasal dari fermentasi susu kerbau ataupun sapi ini, dapat dikatakan sebagai keju semisolid.



Gambar 2.1 Keju Semisolid Dangke yang Dibungkus Daun Pisang

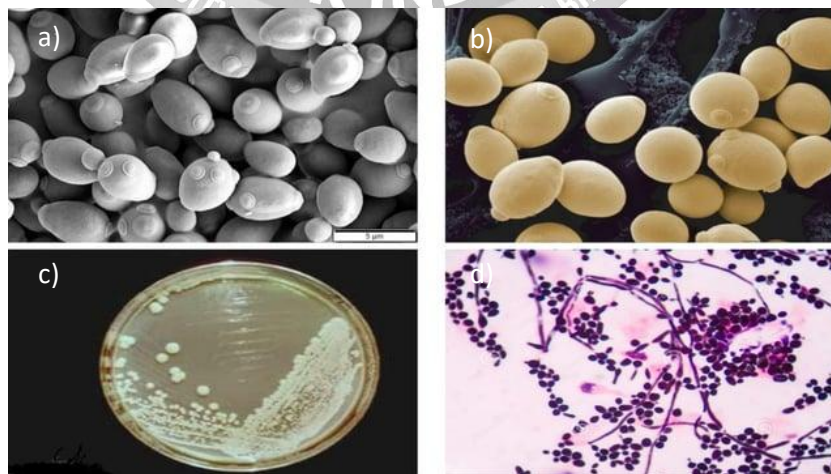
(Sumber: Rahman *et al.*, 2021)

Dangke biasanya diproduksi oleh masyarakat lokal, dimana proses pembuatannya dihasilkan melalui proses pasteurisasi dan koagulasi menggunakan enzim papain untuk memisahkan cairan dan padatan. Dangke sendiri memiliki nutrisi yang mengandung air 45.75%, lemak 32.81%, protein 17.20%, dan mineral 2.32% (Hardiansyah *et al.*, 2020).

Dangke biasanya berbentuk keju lembut yang siap dikonsumsi setelah pemadatan dan pembungkusan dengan daun pisang dan dikonsumsi dengan nasi, atau ditambahkan sayuran dan gula jawa atau hanya dipanggang dan digoreng (Andriani *et al.*, 2019).

2.1.3 Khamir

Khamir merupakan mikroorganisme golongan fungi yang berbentuk uniseluler dan termasuk domain eukariotik yang memiliki daya tahan yang tinggi oleh adanya antibiotik yang biasanya menyebabkan terjadinya fermentasi dan memiliki sifat antimikroba, serta ketahanan terhadap garam, asam, serta gula, yang dapat ditemukan dalam industri pangan untuk membuat makanan dan minuman hasil fermentasi seperti acar, roti, dan bir serta obat (Widiastutik dan Alami, 2014). khamir sendiri merupakan fungi yang bersifat mikroskopik seperti yang dapat diamati pada Gambar 2.2. Sel khamir memiliki ukuran yang berbeda-beda yaitu dengan panjang 5-20 μm dan lebar 1-10 μm . Bentuk sel khamir juga bermacam-macam yaitu ada kokus, silindris, basil, dan apikulat (Kurtzman *et al.*, 2011).

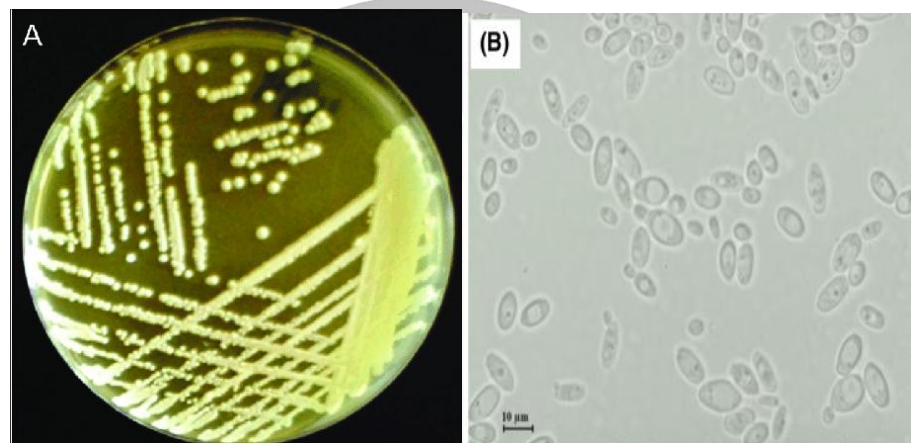


Gambar 2.2 Bentuk morfologi khamir secara makroskopik dan mikroskopik. (a dan b) Morfologi sel khamir diamati dibawah SEM; (c) Morfologi koloni khamir diamati di atas media padat; (d) Morfologi sel khamir diamati dibawah mikroskop

(Sumber: Gaglani, 2019)

2.1.3.1 *Pichia kudriavzevii*

Pichia kudriavzevii merupakan khamir yang memiliki koloni berwarna putih susu. Sel *Pichia kudraivzevii* berbentuk memanjang dan menyerupai butiran panjang seperti nasi dan berdimensi 2.2–5.6 μm dan 4.3–15.2 μm seperti pada Gambar 2.3 berikut:



Gambar 2.3 *Pichia kudriavzevii*. A) Morfologi koloni khamir diamati di atas media padat, (B) Morfologi sel khamir diamati dibawah mikroskop

(Sumber : Al Bshabshe *et al.*, 2019; Khotimah *et al.*, 2023)

Isolat *Pichia kudriavzevii* memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Domain	: Eukariot
Kingdom	: Fungi
Filum	: Ascomycota
Kelas	: Saccharomycetes
Ordo	: Saccharomycetales
Famili	: Pichiaceae
Genus	: <i>Pichia</i>
Spesies	: <i>Pichia kudriavzevii</i> (Kurtzman <i>et al.</i> , 2011)

Reproduksi aseksualnya melalui *budding* (Yadav *et al.*, 2012). Bentuk *teleomorph* isolat ini biasanya ditemukan di tanah di daerah yang lebih hangat dan pada buah, sayuran, dan produk makanan seperti jus buah dan susu fermentasi. Suhu optimal tumbuh pada isolat ini ialah 24-26°C, namun dapat bertahap pada suhu maksimum 43-45 °C. *Pichia kudriavzevii* memiliki berbagai potensi bioteknologi mulai dari produksi pangan hingga aplikasi industri. Khamir ini telah berhasil diisolasi dari berbagai produk pangan termasuk jus buah, makanan fermentasi, dan produk susu dan secara umum dinyatakan aman untuk dikonsumsi berdasarkan US *Food and Drug Administration* (FDA) (Bourdichon *et al.*, 2012)

2.1.3.2 *Kluyveromyces lactis*

Kluyveromyces lactis memiliki kedekatan dengan *Kluyveromyces marxianus* yang memiliki koloni berwarna putih, *cream* hingga merah muda karena menghasilkan pigmen *Pulcherrimin* seperti diperlihatkan pada Gambar 2.4 berikut



Gambar 2.4 *Kluyveromyces lactis*. A) Morfologi koloni isolat khamir, B) Morfologi sel khamir diamati di bawah SEM

(Sumber: Nam men, 2024)

Kluyveromyces lactis dapat hidup di suhu 25°C – 35°C dan dapat diisolasi dari yoghurt, keju, dan bahan olahan fermentasi lainnya. *Kluyveromyces lactis* dapat memfermentasi laktosa sehingga strain ini banyak digunakan pada industri susu untuk menghasilkan yoghurt (Spohner *et al.*, 2016). Selain meningkatkan kualitas keju, banyak penulisan

yang mengisolasi khamir dari keju dan menunjukkan kandidat probiotik potensial seperti yang dilakukan Agarbati *et al.*, (2020).

Isolat *Kluyveromyces lactis* memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Domain : Eukariot

Kingdom : Fungi

Filum : Ascomycota

Kelas : Saccharomycetes

Ordo : Saccharomycetales

Famili : Saccharomycetaceae

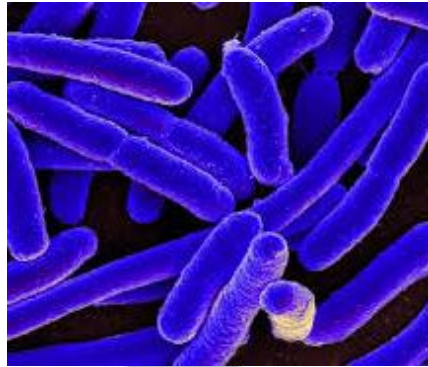
Genus : *Kluyveromyces*

Spesies : *Kluyveromyces lactis* (Kurtzman *et al.*, 2011)

2.1.4 Bakteri Patogen

2.1.4.1 *Enteropathogenic Eschericia coli K.1.1*

Eschericia coli (*E.coli*) ialah bakteri Gram negatif berbentuk basil, berukuran $0.4 - 0.7 \mu\text{m} \times 1.4 \mu\text{m}$ yang diketahui bagian dari flora normal pada saluran pencernaan yang dapat menyebabkan penyakit ketika imunitas menurun. Bakteri ini dapat bersifat patogen terutama akibat toksin yang dihasilkan, serta dapat memecah laktosa dengan cepat. Penyakit saluran pencernaan dapat disebabkan oleh beberapa tipe *E.coli* antara lain *Enteroxigenic E.coli* (ETEC), *Enterohemorrhagic E.coli* (EHEC), *Enteroinvasive E.coli* (EIEC), *Enteropathogenic E.coli* (EPEC), dan *Enteroaggregative E.coli* (EAEC). *EPEC* merupakan *E.coli* yang teridentifikasi dapat menyebabkan diare cair pada anak kecil dan dapat menyebabkan wabah. Penyakit diare yang disebabkan oleh *EPEC* biasanya ditularkan melalui konsumsi makanan yang terkontaminasi, namun juga dapat menyebar dari orang ke orang (Ochoa *et al.*, 2011). Bentuk penampakan bakteri *EPEC K.1.1* dapat dilihat pada Gambar 2.5.

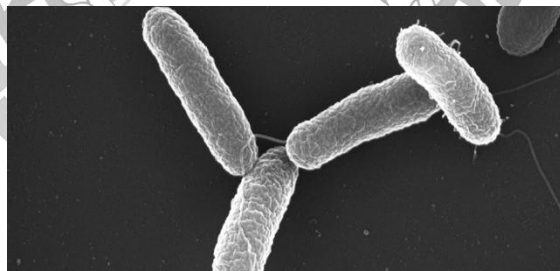


Gambar 2.5 EPEC K.1.1

(Sumber: Daniel M, 2018)

2.1.4.2 *Salmonella typhimurium*

Salmonella enterica serovar Typhimurium merupakan bakteri berbentuk batang Gram negatif, motil dan termasuk dalam enterobacteriaceae seperti pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 *Salmonella typhimurium*

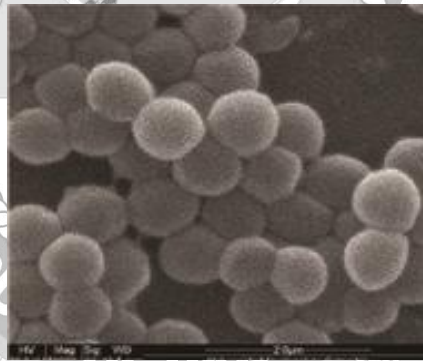
(Sumber: Brinkmann, 2016)

Bakteri ini merupakan patogen fakultatif anaerob yang dapat mengakibatkan gastroenteritis. Bakteri ini tidak memiliki spora, berukuran 1 – 3.5 μm x 0.5-0.8 μm dan gerak positif dengan flagel peritrik. Bakteri ini membutuhkan kondisi tertentu untuk dapat tumbuh dengan optimal, meskipun dapat tumbuh di berbagai lingkungan di luar tubuh inang. Sebagian besar bakteri ini tumbuh pada suhu antara 15-41°C (suhu optimum 37.5°C), dan pH antara 4-9 (Cita *et al.*, 2011). Bakteri *Salmonella typhimurium* penyebab penyakit gastroenteritis ini menimbulkan beberapa gejala awal seperti mual, muntah dan diikuti nyeri abdomen dan demam

(Ehuwa *et al.*, 2021). Diare merupakan gejala yang paling menonjol. Penderita sering kali sembuh dengan sendirinya dalam waktu 1-5 hari, tetapi terkadang dapat menjadi parah dimana terjadi gangguan keseimbangan elektrolit dan dehidrasi (Pui *et al.*, 2011).

2.1.4.3 *Staphylococcus aureus* ATCC

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif yang memiliki bentuk kokus seperti anggur berukuran 0,7-1,2 μm (Gambar 2.7), tersusun dalam berpasangan maupun tidak, tidak bergerak, dinding sel mengandung peptidoglikan dan asam-asam teikoat.



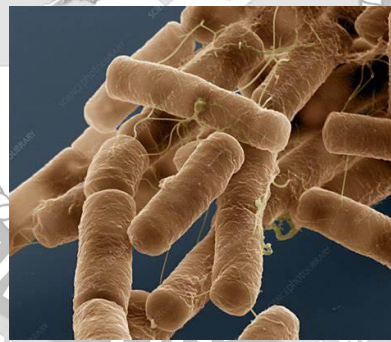
Gambar 2.7 *Staphylococcus aureus* ATCC

(Sumber: Chaparro *et al.*, 2018)

Bakteri ini dapat tumbuh pada media yang mengandung 10% garam dan koloninya biasanya berwarna kuning atau keemasan. Organisme ini dapat tumbuh secara aerobik maupun anaerobik fakultatif pada suhu 18-40°C. Bakteri ini sering dijumpai di lingkungan dan di manusia sebagai flora normal yang berada di kulit dan membran mukosa (Amalia *et al.*, 2016). *S.aureus* juga dapat menyebabkan infeksi seperti meningitis, pneumonia, infeksi kulit, dan gastroenteritis. Bakteri ini dapat hasilkan enterotoksin yang jika dikonsumsi akan menyebabkan gejala mual, muntah-muntah, dan diare yang hebat tanpa disertai demam (Rasigade *et al.*, 2014).

2.1.4.4 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus merupakan bakteri aerob fakultatif, yang memproduksi toxin, dapat membentuk spora dan merupakan bakteri Gram positif dengan penampilan morfologi yang berbeda mulai dari bentuk endospora dan sel vegetatif nya. yang dapat ditemukan di lingkungan maupun makanan. Selnya berbentuk batang besar dan sporanya membengkakkan sporangiumnya serta memiliki ukuran sekitar 1.0-1.2 μm dan panjang 3.0-5.0 μm , memiliki flagella peritrikus, dan dapat bertahan hidup berbagai suhu 10-50 °C (Messelh  user *et al.*, 2018) . Bentuk penampakan bakteri *Bacillus cereus* dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 *Bacillus cereus*

(Sumber: Jalil *et al.*, 2020)

Bakteri ini biasanya menyebabkan penyakit pencernaan seperti mual, muntah, dan diare. Bakteri ini akan menyebabkan penyakit diare jika jumlah bakteri ini melimpah pada suatu makanan yang mengindikasikan terjadinya pertumbuhan dan pembelahan sel secara aktif dan menghasilkan enterotoksin yang bersifat toksik ketika berada di fase eksponensial (Holzel *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2019).

2.2 Hasil Penelitian Terdahulu

Adapaun ringkasan penelitian relevan yang dijadikan sumber referensi terkait kajian dalam penulisan ini, serta perbandingan dengan penulisan yang akan dilakukan, dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 2.1 Penulisan Terdahulu tentang Uji Kandidat Probiotik pada *Pichia kudriavzevii* dan *Kluyveromyces lactis*

No	Penulis	Tujuan	Metode	Hasil	Persamaan	Perbedaan
1	Utama <i>et al.</i> , 2018	Mengisolasi dan mengidentifikasi isolat khamir dari Dangke sebagai probiotik potensial	Memurifikasi isolat dan mengobservasi secara makroskopik dan mikroskopik, dan menguji ketahanan terhadap kondisi asam, kondisi garam empedu, dan kemampuan agregasi terhadap bakteri pathogen <i>Salmonella</i> sp. Isolat khamir diidentifikasi menggunakan sistem Khamir Plus RapID	Isolat teridentifikasi sebagai <i>Candida guilliermondii</i> yang menunjukkan karakteristik probiotik. Koloni khamir berbentuk bulat, berwarna krem, permukaan yang halus, elevasi cembung yang rendah dan mampu tumbuh pada media dengan pH 4, mengandung 1% dan 5% garam empedu dan memiliki kemampuan untuk mengumpulkan <i>Salmonella</i> sp. pada 15, 60, dan 180 menit.	Sampel penulisan (dangke)	Isolat yang terisolasi, metode dan ragam yang diuji dalam pengujian
2	Maione <i>et al.</i> , 2024	Mengisolasi dan mengarakterisasi	Pengujian karakterisasi	Isolat yang berhasil diisolasi adalah khamir <i>Pichia kudriavzevii</i>	Isolat <i>Pichia kudriavzevii</i>	Isolat BAL tidak

		secara <i>In Vitro</i> maupun <i>In Vivo</i> , isolat khamir dan bakteri asam laktat yang diperoleh dari kefir buatan sendiri untuk menilai potensinya sebagai kandidat probiotik.	secara <i>In Vitro</i> diantaranya resistensi terhadap asam dan garam empedu, auto-agregasi, ko - agregasi, hidrofobisitas, dan kemampuan produksi biofilm, serta antioksidannya. Selain itu, dilakukan pengujian keamanan dengan menguji hemolisis dan resistensi antibiotik.	dan <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Horniae</i> BAL dan <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> BAL. <i>P. kudriavzevii</i> menunjukkan sifat probiotik yang menjanjikan untuk makanan fungsional. Kedua Bakteri asam laktat yang diisolasi dapat diklasifikasikan sebagai probiotik potensial dengan sifat yang menguntungkan termasuk aktivitas antimikroba terhadap patogen enterik dan kemampuannya adhesi yang baik pada sel usus.	dan macam pengujian <i>in vitro</i> yang digunakan dalam menguji kandidat probiotik.	diidentifikasi pada penelitian ini, lokasi penelitian
3	Merchan <i>et al.</i> , 2020	Menyelidiki isolat khamir yang berada dalam keju tradisional dari wilayah Extramadura yang kemungkinan berkhasiat dan bermanfaat bagi	Sebanyak 149 isolat khamir dikarakterisasi pada tingkat strain menggunakan teknik ISSR-PCR dengan primer (GTG) ⁵ . Sebanyak 43	Sebanyak 54 strain dipilih dan menunjukkan toleransi terhadap kondisi lambung dan garam empedu yang tinggi, dengan strain <i>Kluyveromyces lactis</i> dan <i>Pichia fermentans</i> memiliki kemampuan yang lebih tinggi dibandingkan dengan strain yang lain, <i>P. fermentans</i> juga merupakan spesies yang menunjukkan	Isolat yang berhasil diisolasi diantaranya <i>Pichia kudriavzevii</i> dan genus <i>Kluyveromyces</i> serta macam pengujian in	Sampel penelitian, lokasi penelitian

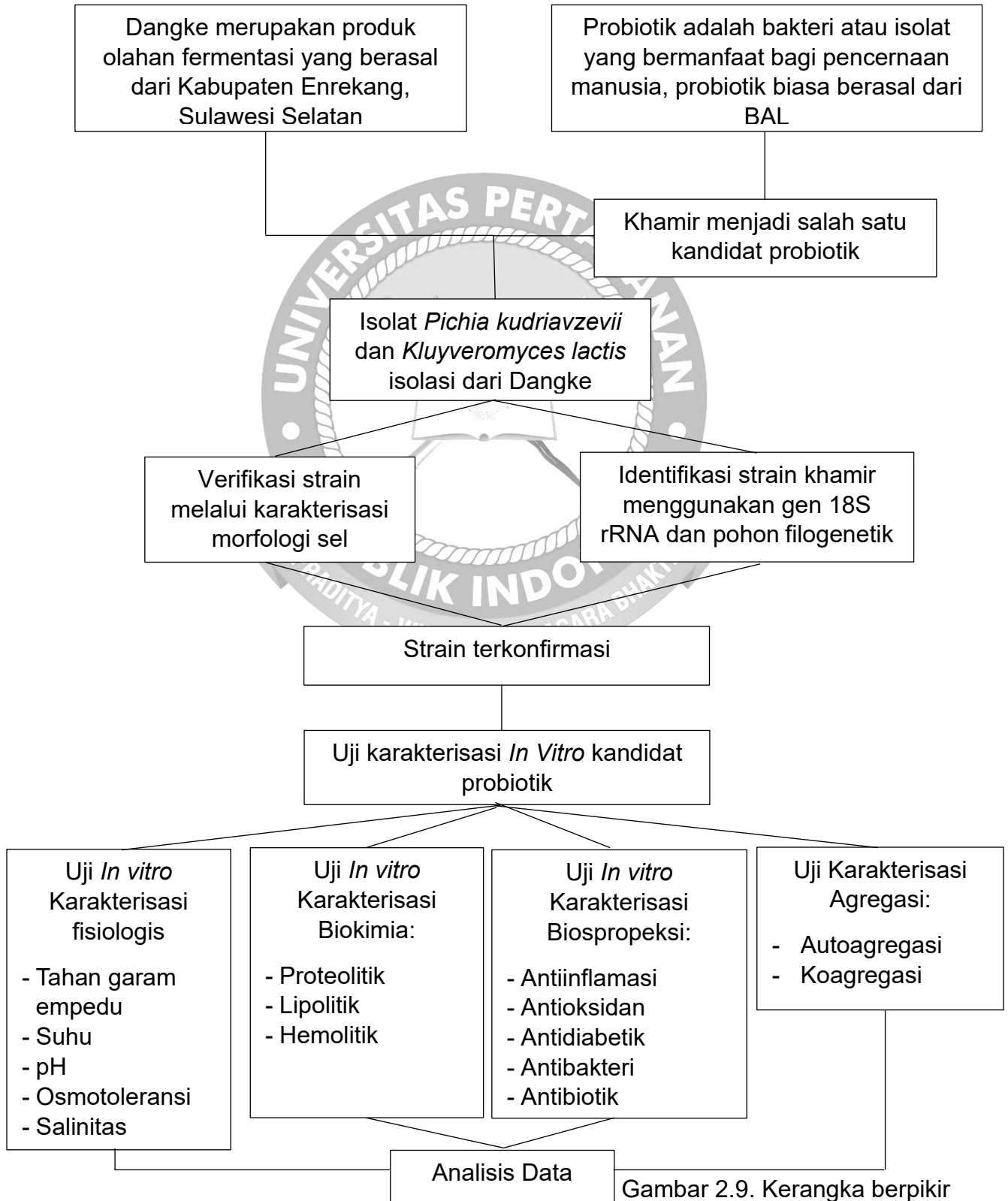
		kesehatan manusia.	profil genetik yang berbeda diperoleh dan khamir dikelompokkan menjadi 12 spesies berdasarkan tingkat genusnya. Pengujian probiotik yang dilakukan yaitu resistan terhadap kondisi lambung dan garam empedu, antioksidan, auto-agregasi, hidrofobisitas, dan anti mikroba.	kapasitas antioksidan, auto-agregasi, dan hidrofobisitas yang lebih baik pada saat yang sama dengan aktivitas antimikroba, diikuti oleh strain <i>Kluyveromyces</i> sp. 15 strain <i>P. fermentants</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>D. hansenii</i> , dan <i>Y.lipolytica</i> merupakan kandidat probiotik potensial yang menjanjikan untuk mengembangkan keju fungsional.	vitro yang digunakan dalam pengujian kandidat probiotik.	
4	Ekawati, et al., 2024	Menentukan keanekaragaman hayati dan keanekaragaman genetik mikrobioma Susu Kuda Sumbawa dengan penekanan pada khamir	Keanekaragaman dan kelompok isolat khamir dievaluasi dengan metode polimorfisme yang diperkuat terkait urutan (SRAP) menggunakan primer ME2F-EM15R (1) dan	Analisis dengan perangkat lunak NTSYS pada hasil SRAP menggunakan Primer 1 mengungkapkan adanya dua kelompok utama, Grup I secara eksklusif terdiri dari K_45 isoalt, dan lainnya termasuk dalam Grup II. Analisis dengan perangkat lunak NTSYS pada analisis SRAP dengan primer 2 menunjukkan dua kelompok utama dengan komposisi yang berbeda.	Metode pengujian	Sampel penelitian

			ME2F-2M12R. (2) Identifikasi molekuler menggunakan primer 18S rRNA dan uji kandidat probiotik dilakukan pada tiga isolat yaitu, K_1, K_6, K_8	Kelompok I terdiri dari K_39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 31, 29, 28, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, dan 21, sedangkan isolat yang tersisa termasuk dalam kelompok II. Hasil analisis 18S rRNA menunjukkan bahwa K_17 dan K_19 masing-masing memiliki kesamaan 99.8% dan 100%, dan diidentifikasi sebagai <i>Candida humilis</i> . K_21, K_31, dan K_45 diidentifikasi memiliki kesamaan 100% dengan <i>Clavispora lusitaniae</i> , sedangkan K_42 memiliki kesamaan 99,8% dengan <i>Candida parapsilosis</i> . Tiga isolat diidentifikasi termasuk dalam genus <i>Ogataea</i> , yaitu <i>Ogataea polymorpha</i> (K_6 dan K_8) dan <i>Ogataea siamensis</i> (K_1) dengan kesamaan masing-masing 100% dan 99,8%		
5	Muche <i>et al.</i> , 2023	Mengisolasi dan mengkarakterisasi potensi khamir probiotik dari isolat <i>Ethiopian injera sourdough</i>	Khamir potensial diisolasi dan diidentifikasi menggunakan analisis berbasis morfologis, fisiologis, biokimia, dan molekuler, termasuk	20 sampel diperoleh 38 isolat. Diantaranya, 10 menghasilkan hidrogen sulfida rendah, atau non-hidrogen. Lima isolat (G1N1, G2N3, G3N1, G8N1, dan B6N3) mampu mentolerir dan tumbuh pada suhu 37°C, dengan kondisi pH rendah, garam empedu, dan efek osmotik yang tinggi. Kelima isolat khamir probioik memiliki satu	Metode pengujian kandidat probiotik	Sampel penelitian, lokasi penelitian, dan isolat <i>Kluyveromyces</i> tidak terisolasi pada sampel ini

			kelangsungan hidup pada suhu berbeda (25, 30, 37, dan 42), pH asam (2,3,4, dan 5), garam empedu (0,1, 0,3, 0,5%), dan osmotoleransi (konsentrasi glukosa 20,30,40, dan 50%), aktivitas antimikroba, proteolitik, lipolitik, serta resistensi terhadap empat antibiotik	nenek moyang yang sama dan termasuk dalam <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (G1N1 dan G2N4), <i>Candida humilis</i> (G3N1 dan B6N3), dan <i>Pichia kudriavzevii</i> (G8N1). Studi ini mengungkapkan bahwa penghuni pertama indera Ethiopia bisa menjadi sumber potensial dari strain khamir probiotik yang berbeda. Penekanan kuat harus diberikan tentang penggunaan khamir probiotik yang diisolasi dari makanan fermentasi Ethiopia		
6.	Mogmenga <i>et al.</i> , 2023	Mengisolasi dan mengarakterisasi minuman tradisional beer yang diproduksi di Burkina Faso	Identifikasi khamir dilakukan dengan metode molekuler PCR-RFLP dan 5.8S-ITS <i>region sequencing</i> .	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (14 strains) teridentifikasi, <i>Pichia kudriavzevii</i> (2 isolat), <i>Rhodotla mucilaginosa</i> (1 strain). Seluruh strain tumbuh dengan baik pada temperature manusia, kecuali <i>R. mucilaginosa</i> . Khamir menunjukkan resirensi yang tinggi jika lingkungan hidupnya disimulasikan dengan kondisi di lambung.	Metode pengujian kandidat probiotik	Sampel penelitian, Lokasi penelitian

2.3 Kerangka Berpikir

Kerangka berpikir dalam penelitian ini disajikan dalam Gambar 2.9. berikut:



Gambar 2.9. Kerangka berpikir

2.4 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan pada penulisan ini adalah khamir *strain Pichia kudriavzevii* dan *Kluyveromyces lactis* dapat menjadi kandidat probiotik fungsional guna mendukung katahanan nasional di bidang kesehatan.

