

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Mikrobioma

Tubuh manusia merupakan rumah bagi berjuta-juta mikroorganisme simbiotik, bahkan perbandingan jumlah sel penyusun tubuh manusia dengan mikroorganisme simbiotik ini mencapai 1:100. Berbagai penelitian terdahulu membuktikan bahwa hal ini berdampak baik terhadap kesehatan manusia. Akan tetapi, manusia bukan satu-satunya hewan yang memiliki mikrobioma dan mikrobioma tidak hanya berdampak terhadap kesehatan (Koch dan Schmid-Hempel, 2011; Sharon dkk., 2010). Penelitian dewasa ini mengungkapkan peran tidak terduga dari mikrobioma bahwa mikrobioma turut mempengaruhi pola makan hingga interaksi sosial dan perilaku inangnya (Sharon dkk., 2010; Heijtz dkk., 2011).

Mikrobiota bisa ditentukan oleh perilaku hewan inangnya (lihat Tabel 1). Serangga kudzu, *Megacopta cribaria*, yang merupakan hama pertanian, lahir tanpa simbiosis apa pun. Setelah lahir, serangga ini membutuhkan simbiosis spesifik dari kapsul bakteri yang diletakkan induknya di dekat telur. Jika kapsul ini dipindahkan, serangga-serangga yang baru lahir akan memperlihatkan perilaku pencarian yang dramatis untuk menemukan kapsul simbiosis tersebut (Hosokawa dkk., 2008).

Ketika asosiasi inang-mikrobia terjadi, mikrobia akan mempengaruhi perilaku inang melalui cara yang lebih kompleks dari pengaruh ekologi dan evolusi inangnya (Tabel 2). Lalat buah (*Drosophila melanogaster*) sangat cenderung memilih kawin individu lain yang memiliki pola makan yang sama,

namun perlakuan antibiotik menghapuskan penemuan tersebut dan inokulasi dari lalat yang diberi perlakuan dengan mikrobial dari media makan menunjukkan bahwa mikrobial-lah yang mempengaruhi perilaku kawin, bukan jenis makanan. Hal ini ternyata dipengaruhi oleh kehadiran satu bakteri, yaitu *Lactobacillus plantarum* (Sharon dkk., 2010).

Tabel 1. Perilaku Hewan Mempengaruhi Mikrobioma

Hewan	Spesies Mikrobial atau Konsorsium	Hubungan dengan Perilaku	Implikasi
Serangga Kudzu (<i>Megacopta cribaria</i>)	<i>Ishikawaella capsule</i>	Ketika lahir, serangga memakan kapsul simbiotiknya, jika tidak ada, nimfa akan tampak melakukan pencarian	Perilaku menentukan akuisisi simbion
Green Iguana (<i>Iguana iguana</i>)	Mikrobial usus	Iguana remaja makan tanah atau feses untuk menyesuaikan mikrobiota dengan makanan terkini	Hewan bisa menentukan mikrobiota pada tahap kehidupan yang berbeda
Bobtail Squid (<i>Euprymna scolopes</i>)	<i>Vibrio fischeri</i>	Cumi-cumi mengeluarkan bakteri bioluminesen setiap hari	Hewan bisa secara aktif mengontrol populasi simbiotiknya

(Sumber: Ezenwa dkk., 2012)

Efek mikrobial pada senyawa kimia yang dihasilkan inang juga dikaitkan dengan perubahan interaksi mangsa-predator dan pola makan. *Anopheles gambiae* hanya menyalurkan malaria pada manusia yang mengeluarkan isyarat kimia tertentu dari kulitnya. Beliau juga menemukan bahwa manusia dengan keanekaragaman mikrobial lebih tinggi menjadi lebih tidak menarik bagi nyamuk ini. Banyaknya *Pseudomonas spp.* dan *Variovorax*

spp. juga berasosiasi terhadap rendahnya ketertarikan nyamuk ini. Kedua bakteri ini diduga memproduksi senyawa kimia tertentu yang membuat nyamuk ini enggan mendekati kulit manusia (Verhulst dkk., 2011).

Tabel 2. Mikrobia Mempengaruhi Perilaku Inang

Hewan	Spesies Mikrobia atau Konsorsium	Hubungan dengan Perilaku	Implikasi
Lalat buah (<i>Drosophila melanogaster</i>)	<i>Ishikawaella capsulate</i>	Mikrobiota dari makanan spesifik mempengaruhi pilihan pasangan kawin	Mikrobia bisa mengendalikan spesiasi
Nyamuk (<i>Anopheles gambiae</i>)	Mikrobiota pada kulit manusia	Mikrobia pada kulit manusia mempengaruhi ketertarikan nyamuk	Daya tarik yang berbeda mempengaruhi penyebaran penyakit
Tikus (<i>Mus musculus</i>)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i> menurunkan kegelisahan pada tikus	Mikrobia bisa mengubah suasana hati

(Sumber: Ezenwa dkk., 2012)

B. *Pongo pygmaeus*

Orangutan merupakan hewan arboreal yang mempunyai gaya hidup soliter dan mempunyai ukuran tubuh besar (Setia, 2009). Orangutan muncul pertama kalinya pada awal Miosin dengan asal daerah penyebaran adalah Indocina. Pada masa Pleistosen orangutan ditemukan menyebar dari Cina Selatan menuju Laos, Vietnam, Semenanjung Malaya dan terus ke pulau Sumatera, Jawa, dan Kalimantan. Pada saat sekarang orangutan hanya ditemukan di Sumatera bagian utara dan Kalimantan saja, sedangkan di tempat lain sudah punah. Orangutan pertamakali telah dideskripsi pada awal abad 17 dan kemudian diberi nama *Simia satyrus*. Berdasarkan International Commission on Zoological Nomenclature tahun 1927 nama orangutan

berubah menjadi *Pongo pygmaeus* (Brandon-Jones dkk., 2004). Orangutan termasuk kera besar dengan klasifikasi menurut Groves (2001) sebagai berikut.

Kingdom : Animalia
 Filum : Chordata
 Subfilum : Vertebrae
 Kelas : Mamalia
 Ordo : Primata
 Family : Pongidae
 Subfamily : Pongoninae
 Genus : Pongo
 Species : *Pongo abelii* (Orangutan Sumatera)
 Pongo pygmaeus (Orangutan Kalimantan)

Hingga saat ini ada dua anak jenis orangutan, yaitu: *Pongo abelii*, penyebarannya di Sumatera dan *Pongo pygmaeus* di Kalimantan dengan 2 anak jenis, yaitu: *Pongo pygmaeus pygmaeus* (di bagian barat dan sebelah utara Sungai Kapuas, Indonesia dan bagian barat Sarawak, Malaysia) dan *Pongo pygmaeus wurmbii* (bagian barat daya Kalimantan, antara Sungai Kapuas dan Barito) (Brandon-Jones dkk., 2004). Hasil terbaru dari *Orangutan Population and Habitat Viability Assessment* (Singleton dkk, 2004) membedakan populasi orangutan Kalimantan yang berada Kalimantan Timur (sebelah selatan Sungai Mahakam, Indonesia dan Sabah, Malaysia) sebagai anak jenis ke tiga dari *Pongo pygmaeus* yaitu: *Pongo pygmaeus morio*.

Orangutan hidup di hutan tropik dengan tipe habitat hutan rawa, hutan dataran rendah sampai hutan dataran tinggi lebih kurang 1500 dpl. Hidup orangutan lebih sering di pepohonan (arboreal) dan sering pada ketinggian antara 10 samapi 20 meter di lapisan tengah kanopi hutan. Walau sering di pepohonan, kadang-kadang orangutan turun juga ke permukaan tanah untuk

memakan tanah, serangga ataupun makanan yang lainnya. Orangutan adalah pemakan buah (frugivorous), tetapi selain itu memakan juga bagian lain dari tumbuh-tumbuhan seperti: daun, kulit batang pohon, batang liana, bunga dan biji. Berdasarkan penelitian Rodman (1977) maka diketahui bahwa proporsi bagian makanan yang dimakan antara lain 53,8 % terdiri dari buah, 29 % terdiri dari daun, 14,2% terdiri dari kulit kayu, 2,2% bunga dan 0,8% serangga.

Berat badan orangutan betina dewasa berkisar 35-55 kg dan jantan dewasa 85-110 kg, sedangkan berat bayi yang baru lahir sekitar 1-2 kg (rata-rata 1,8 kg) (Wich dkk., 2004). Perkembangbiakan orangutan diawali dengan pubertas atau dewasa, dimana proses reproduksi mulai terjadi. Pubertas pada orangutan jantan peliharaan umumnya terjadi pada umur 8 tahun, sedangkan pada orangutan liar terjadi kira-kira pada umur 10 tahun. Masa pubertas betina peliharaan pada umur sekitar 6 tahun, sedangkan yang hidup liar antara 12-13 tahun. Orangutan betina siap bereproduksi pada usia sekitar 14 tahun yang diawali dengan estrus (Wich dkk., 2004). Galdikas (1986) menjelaskan bahwa estrus adalah periode dimana hewan betina mempunyai keinginan birahi dan bersedia menerima pejantan.

Bayi yang baru lahir akan memegang dengan kuat rambut di tubuh induknya dalam segala aktivitas, seperti pergerakan, makan, dan istirahat. Akan tetapi, eksplorasi penjelajahan bayi, jarak bayi dengan induk akan berangsur bertambah seiring waktu berjalan. Masa transisi dari bayi menjadi kanak-kanak terjadi secara bertahap (Mackinnon, 1974). Hal ini disebabkan

batas tahapan perkembangan orangutan dimulai pada masa kanak-kanak (Horr, 1972).

Ekologi orangutan mencakup pola makan, habitat, perilaku sosial, daerah jelajah, perilaku bersarang dan lain-lain. Sejak laporan pertama tentang orangutan diterbitkan, satwa ini dikenal sebagai pemakan buah. Pola makan ini sangat mempengaruhi kondisi biologis dan cara hidupnya. Oleh karena itu, distribusi jumlah dan kualitas makanannya menurut waktu dan tempat tertentu merupakan faktor penentu utama perilaku pergerakan, kepadatan populasi yang akhirnya menentukan organisasi sosialnya (Custance dkk., 2001).

Orangutan memperlihatkan banyak variasi ekologi dan perilaku sosial individunya karena perbedaan seks, umur, kondisi reproduksi, status sosial dan juga keterampilannya (Custance dkk., 2001). Selanjutnya, Rijksen (1978) orangutan juga berbakat untuk mengembangkan pola hubungan yang kompleks, yaitu individu dominan berperan mengontrol dan melindungi sesamanya. Kemampuan ini sangat berperan dalam organisasi sosial orangutan untuk mempertahankan tingkat sosial relatif tinggi jika kondisinya memungkinkan (Meijaard dkk., 2011).

Salah satu perilaku sosial yang cukup menonjol bagi anak orangutan adalah sosial bermain. Permainan dalam lingkungan sosial menunjukkan perbedaan-perbedaan sosial yang menarik (Singleton dan van Schaik, 2001). Selain perilaku bermain, perilaku sosial anak orangutan yang paling dominan adalah kontak dengan induknya. Anak orangutan (jantan dan betina) umur 0-4 tahun biasanya berpegang pada induknya saat bergelantungan di pohon dan

masih menyusu pada induknya, sedangkan pada umur 4-7 tahun anak orangutan akan berpindah bersama induk dari satu pohon ke pohon lainnya tetapi sudah mulai terlepas dari induk saat berpindah dan juga masih tetap menyusu pada induk, dan benar-benar akan bebas dari induk pada umur 7-12 tahun walaupun kadang-kadang akan bergerak pindah juga bersama induk dalam satuan lain (betina) (Galdikas, 1986).

Perilaku sosial orangutan dapat terganggu dengan tingginya aktivitas manusia. Penebangan hutan, perburuan, perdagangan hewan, degradasi habitat dan konversi lahan, serta ekspansi manusia menyebabkan banyak orangutan menjadi yatim piatu, dibawa keluar dari hutan, dikandangan, bahkan dibunuh (Rijksen, 2001; Rijksen dan Meijaard, 1999; Russon, 2009). Pemeliharaan orangutan di dalam kandang dapat mengganggu pertumbuhan dan perkembangan orangutan. Kebanyakan orangutan yang dikandangan merupakan bayi usia 1-4 tahun. Orangutan yang dibesarkan tanpa induk akan kehilangan kesempatan belajar bertahan hidup dan bersosialisasi (Fox dkk., 1999; Russon, 2003; van Noordwijk dan van Schaik, 2005).

Lingkungan kandang tidak mendukung kesempatan untuk pembelajaran mengenai keahlian yang dibutuhkan dalam hutan (ketrampilan) dan orangutan yatim piatu menunjukkan kompetensi yang rendah terhadap hutan (Bowden, 1980; Kaplan dan Rogers, 1994; Rijksen dan Rijksen-Graatsma, 1975). Orangutan yatim piatu juga tidak suka bersosialisasi dengan orangutan lainnya dan hal ini menurunkan kemampuan dan pengalaman bersosialisasi sesuai usianya. Banyak dari orangutan yatim piatu menunjukkan

ketidakmampuan bersosialisasi yang ditandai dengan gejala depresi, seperti lesu, menarik diri dari segala bentuk sosialisasi, mudah takut, dan mengalami defisiensi perilaku sosial (Harlow, 1961; Russon, 2009).

Menurut International Union for Conservation of Nature (IUCN), orangutan digolongkan dalam kategori *Critical Endangered*. Hal tersebut berarti orangutan memiliki resiko yang sangat tinggi untuk punah. Penurunan populasi orangutan, khususnya di Kalimantan, dari beberapa tahun terakhir dan beberapa tahun yang akan datang dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3, dapat diketahui dua penyebab utama penurunan populasi orangutan, yaitu (1) habitat yang berkurang, bahkan hilang, dan (2) perburuan. Selama kurang lebih 30 tahun dari tahun 1973-2010, populasi orangutan menurun drastis hingga mencapai 64% dan diprediksi total penurunan jumlah orangutan hingga tahun 2025 mencapai lebih dari 80%.

Tabel 3. Persentase Penurunan Orangutan Kalimantan dari Beberapa Faktor

	Habitat Hilang	Penurunan Habitat akibat Pebangan Hutan	Penurunan Jumlah Area Aman/ Produktif	<i>Net Hunting</i> (Minus Pertumbuhan)	Total Penurunan Populasi
1973-2010	39%	7%	n/a	18%	64%
2010-2025	37%	n/a	20,2%	7%	58%
1950-2025	61,5%	4%	8,7%	12%	86,2%

(Sumber: IUCN, 2016)

Pada rentang tahun 1973–2010, sekitar 39% hutan di Kalimantan hilang, yang berarti orangutan kehilangan habitat alaminya seluas 98.730 km² (Gaveau dkk., 2014). Wich dkk. (2012) memprediksi, antara tahun 2010-2025,

sebanyak 37% dari sisa luas habitat yang layak untuk orangutan (155.106 km²) akan diubah menjadi perkebunan. Hal tersebut berarti orangutan akan kehilangan habitat lagi sebesar 57.140 km². Pada tahun 2025, lebih dari 61,5% habitat orangutan dipastikan akan hilang.

Selain hilangnya habitat, degradasi habitat akibat penebangan selektif juga sangat berdampak pada penurunan populasi orangutan hingga mencapai 56% sejak tahun 1973 (Gaveau dkk., 2014). Dampak dari perburuan juga tampak jelas terhadap penurunan jumlah orangutan di Kalimantan. Meijaard dkk. (2011) mengestimasi ada 630–1.357 ekor orangutan terbunuh di tahun 2008 dan rata-rata yang telah terbunuh hingga saat ini mencapai 2.383–3.882 per tahun. Dampak dari hilang dan berkurangnya habitat, serta perburuan menyebabkan penurunan populasi hingga 86% dari tahun 1973-2025 sehingga orangutan diklasifikasikan dalam kategori *Critically Endangered*.

C. Mikrobia dan Kesehatan Mental Primata

Penelitian terbaru menggunakan mencit menunjukkan bahwa mikrobia pada usus mempengaruhi stres, kegelisahan, dan depresi (Bravo dkk., 2011; Heijtz dkk., 2011). Mencit yang diberi makan dengan tambahan probiotik *Lactobacillus rhamnosus* bisa menjalani tes renang paksa lebih baik, mengindikasikan rendahnya kegelisahan, dan menunjukkan ekspresi reseptor asam γ -aminobutarat yang lebih tinggi pada otak (Bravo dkk., 2011).

Lingkungan merupakan faktor yang cukup penting dalam perkembangan organisme. Menurut Seckl dan Meaney (2004), fenomena ini disebut *developmental programming*, yaitu suatu proses ketika faktor

lingkungan berperan dalam tahap perkembangan organisme yang rentan sehingga menghasilkan dampak pada struktur dan fungsi organ, yang pada beberapa kasus dampak tersebut bertahan sepanjang hidup organisme yang bersangkutan. Salah satu contohnya adalah mikrobia usus yang sudah beradaptasi melalui proses evolusi sehingga menghasilkan hubungan simbiotik dengan mamalia (Ley dkk., 2008). Tepat setelah suatu organisme lahir, mikrobia *indigenous* dengan cepat dan menyeluruh membentuk populasi pada organisme tersebut. Melalui penelitian Hooper dan Gordon (2001) serta Lundin dkk. (2008), menempel dan berkembang biaknya mikrobia *indigenous* pada organisme yang baru lahir telah membuktikan adanya proses *developmental programming* dalam penentuan fungsi barrier epitelium, homeostasis usus, angiogenesis, dan fungsi imun adaptif pada inang. Fakta ini memunculkan kemungkinan-kemungkinan yang ada bahwa mikrobia pada usus bisa mempengaruhi perkembangan dan fungsi organ pada suatu organisme.

Bakteri probiotik merupakan organisme yang tidak hanya hidup di dalam usus, melainkan ikut berkontribusi dalam kesehatan inangnya (Gareau dkk., 2010). Hubungan antara mikrobiota usus dengan sistem saraf pusat semakin ditunjukkan oleh bukti-bukti yang terus meningkat. Hal ini disebut *microbiome-gut-brain axis* (Bercik dkk., 2010). Pada mamalia, perkembangan fungsional otak terbukti rentan terhadap faktor internal maupun eksternal, seperti lingkungan, terutama pada masa prenatal. Studi epidemiologi mengindikasikan hubungan antara gangguan perkembangan saraf, seperti

autisme dan skizofrenia, dengan infeksi mikrobial patogen pada masa prenatal (Finegold dkk., 2002; Mittal dkk., 2008). Penemuan ini didukung oleh studi pada rodensia yang menunjukkan bahwa paparan mikrobial patogen menyebabkan perilaku tidak normal, seperti kegelisahan dan gangguan fungsi kognitif (Goehler dkk., 2008; Bilbo dkk., 2005; Sullivan dkk., 2006). Silk dkk. (2009) dan Rao dkk. (2009) menambah bukti klinis yang menunjukkan dugaan bahwa probiotik bisa mempengaruhi respon terhadap stress dan mengubah suasana hati dan kegelisahan. Penelitian terbaru ada yang menunjukkan bakteri komensal, *Bifidobacteria infantis*, mampu mengatur metabolisme triptofan, dengan kesan bahwa mikrobiota pada usus bisa mempengaruhi produksi prekursor serotonin (5-HT) (Desbonnet dkk., 2008).

Yildirim dkk. (2010) melakukan penelitian untuk mengetahui mikrobial pada primata yang hidup di alam liar. Penelitian ini menemukan bahwa dari sembilan primata terdapat bakteri dari filum Firmicutes yang memiliki persentase sekuens genom paling tinggi (65–79%), Bacteroidetes (5,5–19,3%), Verrucomicrobia (0,3–2,6%), Tenericutes (0,07–6,1%), Proteobacteria (0,6–2,2%), Actinobacteria (0,03–1,3%), dan Spirochaetes (0,02–2,6%).

Penelitian ini kemudian dilanjutkan ke tingkat genus. Genus yang teridentifikasi dari kesembilan primata adalah *Oscillabacter*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, and *Caprococcus* dengan kelimpahan tertinggi, disusul *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Oscillabacter*, *Anaerovorax*, *Novosphingobium*, *Caprococcus*, *Parabacteroides*, *Blautia*, *Faecalibacterium*,

Subdoligranulum, *Anaerotruncus*, *Anaeroplasma*, dan *Dorea* dengan jumlah yang bervariasi antara tiap primata, dan genus *Hespellia*, *Paipillibacter*, *Alistipes*, *Acetivibrio*, *Victivallis*, *Butyricoccus*, *Caprobacillus*, *Campylobacter*, *Anaeroflium*, *Prevotella*, *Butyrivibrio*, *Oxalobacter*, and *Treponema* dengan kelimpahan yang rendah dan tidak ditemukan di semua primata. Sementara itu, Szekely dkk. (2010) dengan metode PCR berhasil mengidentifikasi bakteri dari genus *Clostridium*, *Lactobacillus*, dan *Bifidobacterium* dari feses salah satu primata, yaitu simpanse.

D. Teknik Identifikasi Mikrobia pada Usus

Pendekatan yang dapat dilakukan untuk menganalisa genom dari mikrobia yang hidup dalam usus orangutan adalah melalui pengambilan sampel secara noninvasif. Berbeda halnya dengan pengambilan sampel secara invasif, pengambilan sampel secara noninvasif tidak memerlukan penangkapan ataupun bersinggungan langsung dengan hewan uji. Hal ini tentu dapat menghilangkan resiko stres hewan uji dan penggunaan obat bius yang berbahaya (Gardipee, 2007). Metode ini juga sesuai digunakan dalam penelitian ini mengingat orangutan merupakan hewan arboreal yang menghabiskan banyak masa hidupnya di atas pohon sehingga sulit untuk ditangkap (Setia, 2009). Menurut Taberlet dkk., 1999), sampel yang diperoleh secara noninvasif dapat berupa feses, urin, rambut, bulu, kulit, dan tengkorak.

Feses merupakan salah satu sampel yang populer digunakan sebagai sumber DNA dalam analisis molekuler. Satu gram feses dapat mengandung

sejumlah besar *fecal* DNA yang berasal dari sel-sel epitel usus yang terlepas selama proses pencernaan berlangsung (Wasser dkk., 1997; Piggot dan Taylor, 2003). Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi kualitas dan kuantitas *fecal* DNA adalah usia feses. Usia feses sangat penting karena menentukan durasi feses terpapar kondisi lingkungan di sekitarnya, antara lain suhu, kelembaba, dan paparan sinar matahari yang dapat mempengaruhi aktivitas bakteri pendegradasi dalam menentukan kualitas dan kuantitas amplifikasi DNA. Sampel feses yang baik adalah yang berusia kurang dari 24 jam karena masih mengandung banyak lendir pada permukaannya (Fernando dkk., 2003).

Faktor lainnya yang juga mempengaruhi kualitas dan kuantitas *fecal* DNA adalah metode pengawetan sampel dan suhu lingkungan. Menurut Fernando dkk. (2003), metode pengawetan sampel yang disarankan adalah menggunakan etanol 95% atau *buffer* penyimpanan yang mengandung DMSO/EDTA/Tris/larutan garam karena mampu mengawetkan sampel hingga lebih dari tiga tahun. Penggunaan *buffer* penyimpanan harus teliti dengan memperhatikan rasionya terhadap jumlah sampel. Suhu juga dapat mempengaruhi penyimpanan sampel karena pada suhu tinggi atau sekitar 37°C aktivitas endonuklease dan enzim hidrolitik lainnya meningkat sehingga dapat menurunkan kualitas dan kuantitas DNA yang diperoleh (Nsubuga dkk., 2004).

DNA memiliki komponen yang bisa digunakan untuk mengidentifikasi bakteri, yaitu basa guanin (G) dan sitosin (C) (Sigal dkk., 1963). Salah satu teknik di dunia molekuler yang sensitif dan spesifik untuk mendeteksi dan

mengidentifikasi mikrobia adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Owen dkk., 1999). PCR merupakan teknik yang menggunakan *thermal cycler* untuk mengamplifikasi fragmen gen spesifik yang dilakukan dalam tiga tahapan, yaitu denaturasi DNA untai ganda menjadi untai tunggal, amplifikasi DNA untai tunggal dengan primer spesifik, dan ekstensi primer dengan enzim polimerase. Proses ini menghasilkan fragmen DNA target secara eksponensial sesuai dengan jumlah siklus yang dilakukan (Dwiyitno, 2005).

Keberhasilan proses PCR sangat ditentukan oleh primer yang digunakan. Desain primer harus spesifik, memiliki temperatur leleh (T_m) setara dengan primer *forward* dan *reverse* dengan komposisi basa G-C tidak kurang dari A-T. Dengan begitu, primer diharapkan mampu mengenali fragmen DNA target dengan mudah (Dwiyitno, 2005).

Hasil PCR dapat divisualisasi menggunakan gel elektroforesis. Fragmen DNA berupa pita akan muncul pada gel dan hasil PCR positif ditandai dengan ukuran fragmen DNA yang muncul sesuai dengan ukuran fragmen DNA target. Namun, hasil elektroforesis saja tidak cukup untuk membuktikan bahwa fragmen DNA yang muncul adalah benar-benar DNA target. Untuk itu, perlu dilakukan konfirmasi lebih lanjut, salah satunya dengan sekuensing (Dwiyitno, 2005).

Sekuensing DNA merupakan teknik yang akurat untuk mengidentifikasi spesies. Sebelum proses sekuensing, produk PCR dimurnikan untuk menghilangkan kontaminan, seperti sisa primer maupun bahan lainnya

yang digunakan selama PCR. Hasil sekuensing berupa kromatogram yang tersusun atas nukleotida dari fragmen DNA target. Kromatogram kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak, seperti *Bionumerics*, *ChromasPro*, dan *BioEdit*. Analisis selanjutnya yang dilakukan adalah analisis indeks kemiripan yang bisa dilakukan dengan cara membandingkan sekuens yang diperoleh dengan sekuens dari *database* yang tersedia di GenBank (ncbi.nlm.nih.gov) dan EMBL (www.ebi.ac.uk) dengan teknik BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Dwiyitno, 2005).

Identifikasi bakteri dengan metode PCR memiliki tingkat sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan teknik konvensional dengan kultur pada media selektif. Hasil penelitian Aabo dkk. (1995) menunjukkan bahwa sensitivitas metode identifikasi dengan PCR sebesar 92%, sedangkan dengan metode konvensional hanya 50%. Bahkan pada teknik PCR-multipleks, identifikasi beberapa bakteri yang berbeda dapat dilakukan pada saat yang bersamaan, memungkinkan waktu identifikasi lebih cepat dengan biaya lebih murah. Identifikasi molekuler juga memungkinkan seleksi antara bakteri potensial virulent dengan non virulent pada spesies yang sama melalui teknik hibridisasi.

Dalam penelitian ini, gen target yang digunakan untuk menganalisa keragaman genom *Lactobacillus* dan *Bififobacterium* adalah gen 16S-rRNA. Menurut Madigan dkk. (1997), penggunaan gen 16S-rRNA dalam menganalisa keragaman genom memiliki beberapa kelebihan, antara lain (1) bersifat universal: *protein synthesis machinery*; (2) sekuen basa-basanya

bersifat konservatif; (3) jumlahnya melimpah dalam sel; (4) memenuhi ukuran untuk perhitungan secara statistika (tidak terlalu panjang dan terlalu pendek); dan (5) ketersediaan informasi (data bank/database di GenBank).

Ribosomal RNA (r-RNA) merupakan makromolekul yang berperan sebagai kerangka dari ribosom untuk proses translasi. R-RNA identik secara fungsional dalam produksi protein. Meski demikian, sekuen di bagian-bagian tertentu terus berevolusi dan mengalami perubahan pada level struktur primer sambil tetap mempertahankan struktur sekunder dan tersier yang homologus (Schluenzen dkk., 2000).

Molekul rRNA sangat khas karena disusun oleh daerah-daerah yang tingkat kelestariannya (*conserved region*) sangat tinggi, dibandingkan dengan daerah-daerah yang evolusioner. Beberapa bagian RNA berevolusi sangat lambat sehingga filogeni antar taksa yang berdekatan dapat dikonstruksi kembali. Sementara itu, ada juga bagian lain yang cukup bervariasi sehingga dapat digunakan untuk penggolongan spesies ke tingkat genus. Banyaknya posisi pada molekul 16S-rRNA dan 23S-rRNA yang berevolusi secara bebas menyediakan informasi untuk menyusun hubungan filogenetik sekelompok mikroba. Sifat rRNA yang sangat terkonservasi memungkinkan untuk mensintesis primer universal untuk proses PCR yang mampu melekat pada sekuen terkonservasi dari gen rRNA ketiga domain filogenetik: Archaea, Bacteria, dan Eukarya. Daerah yang sangat terkonservasi tersebut seringkali dipakai menjadi situs pelekatan primer dalam rangka mengamplifikasi gen

16S-rRNA secara *in vitro* dari *template* yang diisolasi langsung dari lingkungan (Drancourt dkk., 2000).