

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat pada Usus Ayam Broiler

(The isolated and characteristic *lactic acid bacteria* in broiler's intestine)

Meisji Liana Sari¹, Arfan Abrar¹ dan Merint¹

¹Program Studi Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya

ABSTRACT The objective of the research was to evaluate and characterize of a *Lactic Acid Bacteria* isolated from broiler's small intestine. The research was done by three steps : (1) Isolated *Lactic Acid Bacteria*, (2) Gram colourize and microscopic observation and (3) Inhibitory test with pathogen bacteria. The isolation of lactic acid bacteria was proceed by clone from broiler's small intestine with MRS Broth for 24 hours, thinned until 10^{-9} with serial number, invested in MRS jell, purify by streak plate method and storage the lactic acid bacteria in an MRS angle jell. Gram colourize was done with *crystal violet liquid*, *Iodium*, *Alkohol 95%* and *Safranin*, and also microscopic observation was done by electron microscope with 40 zooming. Inhibitory test with *pathogen bacteria*

was evaluated with *Escherichia coli* as testing bacteria in 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 dan 48 hours incubation period.

The isolation result showed two sample of isolate (A1 dan A2) and consist of the observation in shape as well as colour of the bacteria growth, for sample of isolate A1 the colonies had *coccus* and white colour. The isolate of A2 had *sarcinar*. After that, gram colouring was done and microscopic observation were identified into *gram-negative bacteria became bacill* and *bacill cocco*. Inhibitory test with *pathogen bacteria* showed that it produced antimicrobial with 11 mm clearing zone diameter. The result of the research got *Lactobacillus sp* as the genera of *Lactic Acid Bacteria*.

Keywords: *Lactic Acid Bacteria*, small intestine, broiler,

2013 Agripet : Vol (13) No. 1: 43-48

PENDAHULUAN

Pakan dalam produksi peternakan merupakan komponen yang memerlukan biaya besar. Nilainya dapat mencapai 60-70% dari total biaya produksi. Pakan yang berkualitas yang mengandung zat – zat makanan dalam jumlah cukup dan seimbang sangat dibutuhkan ternak untuk menghasilkan produksi yang optimal.

Menurut Tobing (2002), pakan adalah bahan yang dimakan dan dicerna oleh ternak yang mampu menghasilkan nutrisi yang penting untuk perawatan tubuh, pertumbuhan, penggemukan, dan produksi. Secara umum pakan disebut berkualitas baik bila mengandung zat – zat makanan yang dibutuhkan oleh ternak dalam jumlah cukup dan seimbang baik ditinjau dari segi ekonomi maupun dari segi peranannya dalam mewujudkan performa ternak.

Masalah pakan merupakan masalah yang menjadi beban berat bagi para peternak. Untuk itu kemampuan dalam menekan sekecil mungkin biaya pakan tanpa mengurangi kualitasnya merupakan kunci sukses dalam beternak. Salah satu cara adalah dengan melakukan efisiensi pakan dengan penggunaan probiotik dalam ransum.

Cole (1991) menyatakan bahwa probiotik merupakan salah satu alternatif pakan tambahan pada ternak yang sehat dan aman bagi lingkungan. Selain itu mikroba prebiotik mampu memproduksi substansi berguna, dapat menurunkan populasi mikroba patogen, meningkatkan kesehatan dan daya imunitas ternak (Ziemer dan Gibson, 1998).

Saluran pencernaan pada ayam broiler dimulai dari mulut, tenggorokan, kemudian lambung, usus halus dan usus besar yang dilalui oleh makanan yang dikonsumsi, termasuk bakteri, baik yang bermanfaat maupun yang berpotensi mengganggu kesehatan ternak. Usus pada ternak unggas

Corresponding author: meisji@yahoo.com

ibarat sebuah tabung reaksi yang berisi beragam bakteri dan berbagai nutrisi yang disuplai melalui makanan yang dikonsumsi.

Dalam saluran pencernaan ayam, mikroba terdapat hampir di sepanjang usus. Mikroorganisme utama yang terdapat dalam tembolok, usus halus dan ceca adalah golongan bakteri *Lactobacilli* yang khusus menghasilkan asam laktat dan asam asetat. Sehingga pH dalam tembolok ayam yang baik antara pH 4 – 5 akibatnya organisme yang tidak tahan asam tidak dapat berkembang secara normal (Sjofjan et al, 2003).

Proses isolasi diperlukan untuk melakukan pemisahan bakteri asam laktat dari sumbernya, dimana dari hasil isolasi ini akan diperoleh biakan murni dari bakteri asam laktat yang dapat dijadikan sebagai prebiotik. Pengisolasian ini harus dalam kondisi *anaerob* sehingga didapat bakteri asam laktat yang sesuai dengan harapan.

Untuk mendapatkan isolat bakteri asam laktat yang dapat dijadikan sebagai probiotik dari saluran pencernaan pada ayam broiler, maka perlu dilakukan isolasi dan karakteristik bakteri asam laktat pada usus halus ayam broiler.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya, Inderalaya Kabupaten Ogan Ilir Sumatera Selatan. Penelitian ini menggunakan usus halus ayam broiler strain Arbor Acres yang di ambil dari ternak ayam broiler yang dipelihara oleh peternak yang ada di Kecamatan Inderalaya dengan umur 35 hari sebanyak 1 ekor.

Media kultur yang digunakan merupakan media umum (nutrient Agar) serta media selektif (MRS Ahar dan Broth).

Persiapan media usus halus

Ayam broiler strain Arbor Acres umur 35 hari dipotong, dikeluarkan darahnya dan diletakkan di atas papan bedah. Lalu sayat di bagian media ventral daerah abdomen sehingga otot dada dapat dilepas. Kemudian

seluruh organ saluran pencernaan dikeluarkan lalu diambil bagian usus halusnya dan dipotong sepanjang 1 cm. Usus di masukkan kedalam tabung reaksi yang terisi media selektif MRS Broth 3 ml. Lalu diinkubasi selama 24 jam. 1 ml cairan hasil inkubasi diambil dan dilakukan pengenceran serial sampai 10^{-9} .

Menghitung total koloni yang tumbuh dengan metode cawan agar

Larutan hasil pengenceran 10^{-9} dikultur pada media MRS agar dengan metode pour plate dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi selama 24 jam lalu diamati koloni bakteri yang tumbuh pada media cawan. Koloni bakteri yang dominan dicari dengan mengamati secara morfologis dari bentuk yang seragam dan dari warnanya. Setelah itu di hitung jumlah koloni bakteri yang dominan dengan pengenceran yang mengandung jumlah koloni antara 30 – 300.

Isolasi koloni dengan bentuk koloni dominan

Cawan petri yang berisi media padat MRS agar disiapkan, kemudian 1 koloni dominan dari biakan diambil dengan jarum ose steril berukuran 2 mm. jarum ose digoreskan pada media padat secara hati-hati dengan cara menggerakkan ujung ose ke arah sisi kanan beberapa kali. Ujung ose dibakar dan didinginkan kembali dan cawan diputar 90° , lalu sentuh ujung ose pada area 1 dan digoreskan dengan menggerakkan ujung ose menyilang menuju area 2. Cara yang sama pun dilakukan untuk area 3. Dengan tanpa bakar ose, cawan diputar 90° lalu digoreskan dengan cara yang sama ke area 4. Cawan petri kemudian diinkubasi 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.

Pengamatan morfologis dan pewarnaan garam

Kaca objek yang bersih dan bebas lemak disiapkan dengan cara dibilas terlebih

dulu dengan alkohol 95% hingga bersih. Disiapkan 2 olesan biakan bakteri pada kaca objek dengan jarak antara kedua olesan tersebut paling sedikit 2 cm. Setelah selesai difiksasi panas, kaca diletakkan di atas rak kawat bak pewarna. Olesan bakteri digenangi/ditetesi dengan pewarna primer yaitu ungu kristal selama 1 menit menggunakan pinset. Kaca dimiringkan di atas bak pewarna untuk membuang kelebihan ungu kristal, lalu dibilas dengan aquadest. Kaca objek ditiriskan (dengan cara menegakkan sisi yang sempit kaca objek tersebut di atas kertas serap) dan dikembalikan ke atas rak kawat pada bak pewarna. Olesan kemudian digenangi / ditetesi iodine gram selama 2 menit, kemudian dilakukan seperti langkah sebelumnya. Olesan dicuci dengan pemucat warna etanol 95%, ditetesi selama 30 detik atau sampai zat warna ungu kristal tidak terlihat mengalir lagi. Dicuci kembali dengan aquadest dan ditiriskan. Lalu digenangi dengan safranin pewarna tandingan selama 30 detik. Sediaan diamati dengan mikroskop menggunakan lensa objektif 100 kali, terlebih dulu sediaan ditetesi minyak imersi. Hasil pewarnaan (berwarna ungu : gram positif, berwarna merah : gram negatif).

Penyimpanan isolat pada media MRS Agar

Satu isolate bakteri yang dipilih dari cawan petri diambil dengan menggunakan jarum ose steril berukuran 2 mm. disiapkan tabung reaksi berisi media MRS Agar miring lalu jarum tadi digoreskan di permukaan agar miring dengan hati-hati, lalu diinkubasi sampai biakan tumbuh. Biakan murni akan ditandai dengan karakteristik yang seragam pada semua bagian biakan, seperti warna, keadaan permukaan koloni dll. Dari hasil pemurnian tersebut akan diperoleh isolate bakteri asam laktat.

Uji tantang dengan bakteri pathogen dengan metode zona bening

Satu koloni bakteri asam laktat dari media agar miring diambil dengan menggunakan jarum ose lalu dilarutkan dalam media MRS Broth dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi selama 24 jam, pada 6 jam pertama waktu inkubasi dimasukkan kertas

cakram steril berdiameter 0,5 cm. larutan sampel bakteri pathogen dari sisa air minum pakan ternak yang telah terkontaminasi sebanyak 0,5 ml disiapkan lalu dimasukkan kedalam cawan petri. Kemudian ditutupi dengan media nutrisi agar sampai seluruh bagian tertutupi sampai merata, lalu dibiarkan sampai media membeku. Setelah itu diambil kertas cakram yang telah diinkubasi dengan menggunakan pinset lalu masukkan kertas cakram dan diletakkan di tengah-tengah cawan. Kemudian dilakukan pengamatan setelah 2, 4, 8, 10, 12, 24 dan lebih dari 48 jam adakah zona bening (clear zone) yang terbentuk, lalu ukur diameter zona bening tersebut. Parameter yang diamati: 1) jumlah bakteri asam laktat yang tumbuh, 2) karakterisasi bakteri asam laktat, 3) diameter zona bening (mm) dari produksi antimikroba (gambar terlampir) .



Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis secara deskriptif (Steel dan Torrie, 1993)

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Jumlah Bakteri Asam Laktat Yang Tumbuh

Saluran pencernaan yang berasal dari ayam broiler strain Arbor Acres umur 35 hari diperkaya dengan menggunakan media MRS Broth sebagai media selektif. Media MRS Broth merupakan media khusus untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Setelah diperkaya dalam media MRS Broth selama 24 jam maka dilakukan pengenceran hingga 10^{-9}

untuk memperoleh jumlah koloni bakteri yang tumbuh. Total bakteri koloni asam laktat yang tumbuh adalah sebanyak 133×10^9 cfu/ml. dihitung berdasarkan rumus menghitung koloni bakteri sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{Jumlah koloni / ml} &= \text{jumlah koloni yang tumbuh} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}} \\ &= 133 \times \frac{1}{10^{-9}} \\ &= 133 \times 10^9 \text{ cfu / ml} \end{aligned}$$

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Smith (1965) menunjukkan total bakteri asam laktat yang tumbuh pada saluran pencernaan ayam adalah $8,2 \times 10^{10}$ cfu/ml, sedangkan menurut Abrar dan Raudhati (2006) total bakteri asam laktat yang tumbuh sebanyak $2,1 \times 10^7$ cfu/ml.

Total koloni bakteri asam laktat yang tumbuh pada penelitian ini sangat berbeda jumlahnya dibandingkan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Abrar dan Raudhati (2006). Perbedaan tersebut diperkirakan karena adanya perbedaan umur ayam yang digunakan dan adanya pengaruh pemberian probiotik. Umur ayam yang digunakan pada penelitian Abrar dan Raudhati (2006) antara 1 – 28 hari, sedangkan pada penelitian ini menggunakan ayam berumur 35 hari. Menurut Barrow (1992), faktor – faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba dalam saluran pencernaan ayam adalah umur, respon imunitas, pakan dan pemberian antibiotik.

B. Karakteristik Bakteri Asam Laktat

Metode yang dilakukan dalam melakukan isolasi ini mengikuti penelitian yang dilakukan oleh Abrar dan Raudhati (2006), hanya saja pemurnian yang dilakukan hanya sebanyak 2 kali. Hal ini disebabkan pada pemurnian ke-2 telah diperoleh kultur bakteri dengan bentuk morfologi yang seragam.

Dalam melakukan isolasi dilakukan beberapa proses untuk mendapatkan kultur murni bakteri asam laktat dari sampel usus halus ayam broiler. Proses yang dilakukan meliputi pengayaan sampel bakteri dari usus ayam broiler, pengenceran sampel sampai 10^{-9} , penanaman dengan metode pour plate menggunakan media MRS agar pada cawan, pemurnian bakteri asam laktat dengan metode

streak/ penggoresan pada cawan yang berisi media MRS agar dan penyimpanan kultur murni bakteri asam laktat pada media MRS agar miring dalam tabung reaksi.

Dari hasil isolat didapatkan 2 isolat yang diidentifikasi berdasarkan pengamatan morfologi dari bentuk koloni dan warna koloni yang seragam. Untuk isolat A1 memiliki bentuk koloni bulat sempurna serta memiliki warna putih, sedangkan isolat A2 memiliki bentuk koloni bulat berbintil serta memiliki pH = 4,39 yang diukur dengan menggunakan pH meter. Hasil uji pewarnaan gram dengan menggunakan larutan kristal violet, iodium, ethanol 95% dan safranin. Lalu di amati dengan menggunakan mikroskop, menghasilkan warna merah sehingga diperkirakan sifat pewarna gram dari isolat A1 dan A2 adalah termasuk kedalam bakteri asam laktat gram negatif.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Wiryawan et al, (2003), dari empat isolate yang bersal dari saluran pencernaan ayam berdasarkan pengamatan morfologi didapatkan bahwa koloni bakteri berwarna putih, putih susu, kuning dan krem. Bentuk koloni umbonat, bulat sempurna, bulat bergerigi dan bentuk tak beraturan. Berdasarkan uji pewarnaan gram dan pengamatan mikroskopis termasuk kedalam bakteri gram positif dan memiliki bentuk bulat (kokus) berpasangan dua-dua atau diplokokus.

Menurut Fardiaz (1989), dalam pewarnaan gram sel-sel yang tidak dapat melepaskan warna dan akan tetap berwarna seperti warna kristal violet yaitu biru-ungu disebut bakteri gram positif. Sedangkan sel-sel yang dapat melepaskan kristal violet dan mengikat safranin sehingga berwarna merah-merah muda disebut bakteri gram negatif. Prinsip pewarnaan gram adalah kemampuan dinding sel mengikat zat warna dasar (kristal violet) setelah pencucian dengan alkohol 95%. Keadaan ini berhubungan dengan komposisi senyawa penyusun dinding sel. Pada bakteri gram positif mengandung peptidoglikan lebih banyak dan lemak lebih sedikit dibandingkan bakteri gram negatif (Syulasma et al., 2005).

Dari hasil pengamatan mikroskopis, kedua isolat bakteri asam laktat tersebut

memiliki sel berbentuk batang (*bacil*) dan batang bulat (*bacil cocco*). Sehingga dapat diperkirakan sebagai bakteri asam laktat jenis *Lactobacillus*. Menurut Cullimore (2000), *Lactobacillus* memiliki sel yang berbentuk panjang, batang silinder (kadang-kadang melengkung) sedang yang lain pendek, sering berbentuk *coryne* atau batang bulat. Selnya juga sering membentuk rantai. Walaupun termasuk kedalam bakteri gram positif tetapi ada juga yang bipolar (gram positif dan gram negatif) kemungkinan terjadi akibat granulasi dalam sel. Metabolismenya adalah metabolisme fermentatif dengan merubah setidaknya 50% karbon menjadi asam laktat.

Ray (2001) menyatakan bahwa *Lactobacillus* memiliki ciri-ciri yaitu selnya berbentuk batang dengan ukuran dan bentuk yang sangat beragam, beberapa bias sangat panjang dan beberapa lainnya bersifat batang bulat. Munculnya pada bentuk sel tunggal atau pada rantai yang pendek sampai panjang, anaerob fakultatif, gram positif dan sebagian ada yang gram negatif, kebanyakan spesies tidak bergerak dan mesophylic (tetapi beberapa jenis bersifat psychotrops).

Untuk mengetahui karakterisasi secara umum dari isolat bakteri asam laktat yang diperoleh dari penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Karakterisasi bakteri asam laktat isolate A1 dan A2

Karakterisasi	Isolat	
	A1	A2
Morfologis		
- Bentuk koloni	- Bulat sempurna	- Bulat berbintil
- Warna koloni	- Putih	- Putih susu
Pewarnaan	- Warna merah (-)	- Warna merah (-)
Gram dan Pengamatan Mikroskopis	- Bentuk batang (<i>bacil</i>)	- Bentuk batang (<i>bacil</i>) Dan batang bulat (<i>bacil cocco</i>)
Uji Gula-gula		
- Galaktosa	-	+
- Laktosa	-	-
- Fruktosa	+	+
- Maltosa	+	+
- Glukosa	+	+
Produksi Anti Narkoba	+	+

C. Produksi Antimikroba

Isolat yang diperoleh pada penelitian ini di uji untuk mengetahui produksi antimikrobanya. Antimikroba yang dihasilkan dari isolat dapat diketahui dengan melihat aktivitasnya dalam melawan suatu kultur mikroba yang bersifat patogen dengan menggunakan metode ujiantang. Kultur mikroba patogen pada ini berasal dari air minum sisa pemeliharaan burung puyuh yang telah berwarna keruh dan berbau.

Pada metode ujiantang ini, bakteri patogen yang telah diinokulasi pada cawan dengan menggunakan media nutrient agar (NA). kemudian dikontaminasi dengan isolate bakteri asam laktat yang sebelumnya telah diperkaya pada media MRS Broth selama 24 jam dan pada 6 jam pertama waktu inkubasi di masukkan kertas cakram steril berdiameter 0,5 cm. kemudian kertas cakram tersebut dimasukkan kedalam cawan dan diletakkan ditengah-tengah cawan yang telah berisi biakan bakteri patogen.

Produksi antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dari ujiantang pada penelitian ini ditandai dengan adanya zona bening (clear zone) yang terdapat di sekitar kertas cakram. Produksi antimikroba baru mencapai tingkat optimum ketika telah mencapai 12 jam waktu inkubasi. Panjang diameter zona bening pada saat 12 jam waktu inkubasi adalah 11 mm. untuk mengetahui produksi mikroba yang dihasilkan melalui diameter zona bening dapat dilihat pada Grafik 1 berikut.

Penelitian untuk mengetahui aktivitas antimikroba dengan menggunakan metode ini telah dilakukan juga oleh Wiryawan et al. (2003), hanya saja bakteri uji yang digunakan adalah *Salmonella sp*, dengan panjang diameter zona hambat yang dihasilkan adalah 12 mm.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pada usus halus ayam broiler terdapat bakteri asam laktat jenis *Lactobacillus sp*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrar, A. dan Raudhati, E. 2006. Produktifitas dan aktifitas mikroba saluran pencernaan ayam broiler yang diberi probiotik. Penelitian DIK-S. fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya.
- Barrow, P.A. 1992. Probiotic for chickens in Probiotics The Scientific Basis, Edited by Roy Fuller. Chapman and Hall. London.
- Cole, D.J.A. 1991. The role of the nutritionist in designing feed for the future in feed industry. T.P. Lyons (ed). Proceeding of Altech's. Seventh annual Symposium. Altech Technical Publication. Nicholasville Kentucky :1 - 2
- Cullimore, R.D. 2000. Principal Atlas For Bacterial Identification. Lewis Publisher. United States of America.
- Fardiaz, S. 1989. Penuntun Praktek Mikrobiologi Pangan. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi Fakultas Teknologi Pertanian. IPB Press. Bogor.
- Ray, B. 2001. Dasar – dasar Mikrobiologi Pangan. Diterjemahkan oleh Rindit Pambayun dan Rahmat Hari Purnomo. Jurusan Teknologi Pertanian. Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya.
- Sjofjan, O. Aulani'am. Sutrisdiarto. Rosdiana, A. dan Supiati. 2003. Isolasi dan Identifikasi *Bacillus spp* Dari Usus Ayam Petelur Sebagai Sumber Probiotik. Jurnal Ilmu-ilmu Hayati (life sciences). Vol.15- No.2
- Smith, H. W. 1965. Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. J Pathol Bacteriol. 89:95-122.
- Stell, R.G.D dan Torrie, J.H. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. PT. Gramedia, Jakarta.
- Syulasm, A., Hamdiyati, Y. Dan Kusnadi. 2005. Petunjuk Praktikum Mikrobiologi. Fakultas MIPA. Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.
- Tobing, V. 1992. Beternak Ayam Broiler Bebas Antibiotika Murah dan Bebas Residu. Penebar Swadaya. Jakarta
- Wiryan, K.G. dan Tjakradidjaja, A.S., Ratih, A.M.R. dan Janingrum, E.D. 2003. Isolasi bakteri asam laktat penghasil antimikroba. Jurnal Veteriner Vol 4 (3).
- Ziemer, C.J and. Gibson, G.R. 1998. A overview of Proboitic, Prebiotic and Symbiotic in the functional food concept. Prospectives and Future Strategies. International dairy Journal 8:473-479.