



Detection of Proteolytic Bacteria from *Ileum* of *Gallus Gallus* as a candidate probiotic agent of fermented poultry feeding

Deteksi Bakteri Proteolitik Dari *Ileum Gallus Gallus* Sebagai Kandidat Agen Probiotik Pakan Fermentasi Unggas

Tengku Gilang Pradana¹⁾, Alfath Rusdhi^{*1)} Indah Pratiwi Purba¹⁾

¹⁾Program Studi Peternakan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Pembangunan Panca Budi, Medan, Indonesia.

*e-mail author: gilangpradana@dosen.pancabudi.ac.id

ABSTRACT

The ileum is part of the small intestine that functions as the absorption of food and for the growth and development of bacteria to degrade feed, such as lactic acid bacteria. The purpose of this study was to explore and detect proteolytic bacteria from the *ileum* of *Gallus gallus* as a candidate probiotic agent. The research method is a selection of proteolytic bacteria, catalase, and motility. The results showed that the average proteolytic index in isolates *GP sp. 4*, *GP sp.3*, and *GP sp. 1* were 1.533, 1.531, and 1.500. Nine isolates were gram-positive and one gram-negative (*GP sp. 3*). The ten isolates could hydrolyze hydrogen peroxide, as indicated by the formation of air bubbles. The motility test showed that eight isolates were motile and the other two isolates were non-motile (*GP sp.8* and *GP sp.10*). The ten proteolytic bacterial isolates obtained did not have the potential to be used as probiotic agents for fermented poultry feed because low proteolytic index value.

Keywords: *Ileum*; *Proteolytic Bacteria*; *Probiotics*.

ABSTRAK

Ileum merupakan bagian dari usus halus yang berperan dalam penyerapan sari – sari makanan dan tempat tumbuh berkembangnya bakteri yang dapat mendegradasi pakan, salah satunya adalah bakteri asam laktat. Tujuan penelitian ini untuk menyeleksi bakteri proteolitik dari *ileum Gallus gallus* sebagai kandidat agen probiotik. Metode penelitian meliputi aktivitas bakteri proteolitik, uji katalase dan uji motilitas. Hasil penelitian menunjukkan rata-rata Indeks hidrolisis proteolitik terbesar yaitu pada isolat *GP sp. 4*, *GP sp.3* dan *GP sp. 1* dengan nilai masing- masing 1.533, 1.531, dan 1.500. Sembilan isolat merupakan gram positif dan satu gram negatif (isolat *GP sp. 3*). Kesepuluh isolat dapat menghidrolisis hidrogen peroksida ditandai dengan terbentuknya gelembung udara. Uji motilitas menunjukkan delapan isolat bersifat motil dan dua isolat lainnya bersifat non-motil (isolat *GP sp.8* dan *GP sp.10*). Kesepuluh isolat bakteri proteolitik yang didapatkan tidak berpotensi dijadikan sebagai agen probiotik pakan fermentasi unggas karena memiliki nilai indeks proteolitik yang rendah.

Kata Kunci: *Ileum*; *Bakteri Proteolitik*; *Probiotik*.

PENDAHULUAN

Pakan dengan kualitas baik, setidaknya memiliki kandungan energi, protein dan lemak dalam memenuhi kebutuhan nutrisi ternak sehingga ternak menghasilkan produk yang optimal dari segi kualitas maupun kuantitas. Kandungan protein pada pakan jadi salah satu penentu dari harga pakan. Sumber protein memiliki harga yang relatif mahal tetapi merupakan komponen dengan peranan penting sehingga selalu menjadi prioritas di dalam penyusunan formulasi pakan. Selain itu, protein juga terlibat aktif dalam proses pembentukan jaringan tubuh serta dalam metabolisme vital seperti enzim, hormon, antibodi dan lain sebagainya (Beski *et al*, 2015).

Pakan fermentasi merupakan salah satu cara dalam meningkatkan nutrisi dan memperpanjang umur pakan. Proses pembuatan pakan fermentasi melibatkan probiotik sebagai bioaktivator yang terdiri dari berbagai jenis mikroba dari golongan bakteri maupun fungi. Pemanfaatan probiotik yang terdiri dari campuran dari berbagai spesies mikroorganisme, khususnya mikroorganisme pendegradasi komponen protein (mikroba proteolitik) melalui pakan sehingga dapat meningkatkan produktivitas ternak.

Ileum merupakan bagian dari usus halus memiliki peran dalam menyerap sari-sari makanan dan tempat tumbuh dan berkembangnya bakteri yang dapat mendegradasi pakan yaitu bakteri proteolitik. Bakteri ini merupakan kelompok bakteri dengan kemampuan dalam memecah protein, dengan cara memutuskan ikatan peptida dalam protein. Bakteri proteolitik diidentifikasi berdasarkan adanya zona bening pada sekitar koloni bakteri yang tumbuh di media selektif yang merupakan hasil dari proses perombakan polimer protein yang menghasilkan senyawa peptida dan asam amino (Saidah, 2014).

Potensi bakteri proteolitik dalam memecah senyawa kompleks dalam bentuk protein menjadi senyawa sederhana maupun asam amino sangat diperlukan dalam penyusunan probiotik yang akan digunakan sebagai biostarter dalam pembuatan pakan fermentasi. Bakteri proteolitik memiliki karakteristik substrat dengan tingkat protein yang tinggi dan beberapa penelitian terkait diantaranya adalah berasal dari limbah industri tahu (Karina *et al*, 2014), kotoran hewan luwak (Rahmawaty, 2016) dan limbah cair tahu (Asril *et al*, 2019).

Selain itu, bakteri proteolitik juga ditemukan hidup di sumber air panas (Saidah, 2014) dan padang lamun (Rizaldi *et al*, 2018). Berdasarkan latar belakang diatas, perlu dilakukan penelitian mengenai eksplorasi bakteri proteolitik dari *ileum Gallus gallus* sebagai kandidat agen probiotik dalam pembuatan pakan fermentasi unggas.

METODE PENELITIAN

Isolasi Bakteri Proteolitik

Sampel *ileum Gallus gallus* yang digunakan merupakan hasil pengenceran 10^{-4} sampai 10^{-6} . Pengenceran dilakukan dengan menghomogenkan 1 ml sampel dengan 9 ml aquades steril untuk mendapatkan pengenceran 10^{-1} , selanjutnya diambil 1 ml sampel dari pengenceran 10^{-1} dan dihomogenkan dengan 9 ml aquades steril untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} kemudian dilakukan sampai pengenceran 10^{-6} . Isolasi bakteri dilakukan dengan metode cawan sebar (*streak plate*). Sebanyak 100 μ l sampel di tumbuhkan kedalam media MRSA + CaCO_3 dan inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Uji positif ditandai dengan terbentuknya zona bening akibat dari netralisir asam laktat menjadi Ca-laktat. Setiap isolat yang tumbuh kemudian dipurifikasi untuk di uji lebih lanjut.

Pewarnaan bakteri

Sebanyak 1 ose sampel dioleskan pada objek glass, kemudian diwarnai dengan zat warna basa yaitu violet kristal. Setelah itu, ditambahkan larutan mordant yaitu larutan lugol. Sampel kemudian dicuci dengan alkohol untuk menghilangkan kristal violet. Setelah dicuci dengan air, kemudian diwarnai dengan *counterstain* yaitu safranin. Bakteri yang tidak dapat melepaskan warna dan akan tetap berwarna seperti warna kristal violet, yaitu biru-ungu disebut bakteri gram-positif sedang sel-sel yang dapat melepaskan violet kristal dan mengikat safranin sehingga berwarna merah-merah muda disebut bakteri gram-negatif.

Uji Katalase

Satu ose tiap kultur BAL dipindahkan ke gelas objek, kemudian ditetesi 1-3 tetes larutan H_2O_2 3%. Uji katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara hasil pemecahan asam peroksida oleh enzim katalase yang

dihasilkan BAL. Uji katalase negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung udara.

Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan menusukkan satu ose isolat BAL ke dalam media *Sulfit Indole Motility (SIM)* kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C. Uji positif ditandai dengan adanya pertumbuhan bakteri yang menyebar disekitar tusukan.

HASIL DAN DISKUSI

Aktivitas Bakteri Proteolitik dari *Ileum Gallus gallus*

Indeks proteolitik menunjukkan kemampuan bakteri proteolitik dalam menghasilkan enzim protease. Hasil pengukuran indeks proteolitik dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas Bakteri Proteolitik dari *Ileum Gallus gallus*

Isolat	Diameter Koloni (mm)		Diameter Zona Bening (mm)		Indeks Hidrolisis Proteolitik		
	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam	Relate d
GP sp. 1	6	6	13	17	1.167	1.833	1.500
GP sp. 2	7.5n	11	11.5	21	0.533	0.909	0.721
GP sp. 3	6	7.5	16	18	1.667	1.400	1.533
GP sp. 4	7.5	8.5	19	21.5	1.533	1.529	1.531
GP sp. 5	4.5	12	9.5	22	1.111	0.833	0.972
GP sp. 6	3.5	12	9	20.5	1.571	0.708	1.140
GP sp. 7	7	10	13.5	21	0.929	1.100	1.014
GP sp. 8	7.5	17.5	12.5	25.5	0.667	0.457	0.562
GP sp. 9	7.5	8.5	10.5	16	0.400	0.882	0.641
GP sp. 10	7	8	11.5	14	0.643	0.750	0.696

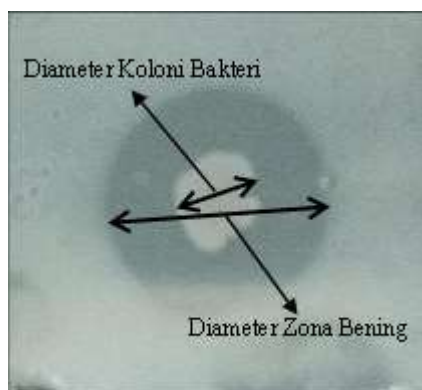
Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat bahwa tiga isolat dengan rata-rata Indeks hidrolisis proteolitik terbesar yaitu *GP sp. 4*, *GP sp.3* dan *GP sp. 1* dengan nilai masing- masing 1.533, 1.531, dan 1.500. Indeks proteolitik pada penelitian ini memiliki nilai lebih kecil jika dibandingkan dengan hasil penelitian Fitriana dan Asri (2022) yang berhasil mengisolasi 7 jenis isolat dari tanaman

kedelai dengan nilai indeks proteolitik sebesar 2,54, 1,77, 1,80. Selain itu, diameter zona bening pada lama inkubasi 48 jam lebih tinggi jika dibandingkan pada lama inkubasi 24 jam dikarenakan enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri proteolitik telah dihasilkan secara optimal.



Gambar 1. Bakteri Proteolitik ditandai dengan terbentuknya zona

Berdasarkan Gambar 1, bakteri proteolitik memiliki karakteristik zona bening disekitar koloni. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni adalah hasil pemecahan protein kasein (susu skim), yang merupakan suspensi koloid berwarna putih transparan dan merupakan senyawa turunan dengan karakter mudah larut (Asril, 2019). Bakteri proteolitik dari *Ileum Gallus gallus* memiliki aktivitas optimal pada masa inkubasi 48 jam. Hal ini disebabkan telah terjadi perubahan fase pertumbuhan bakteri dari fase lag ke fase log (eksponensial). Pada fase ini bakteri memiliki kecepatan berkembang biak secara eksponensial dan berpengaruh terhadap enzim yang dihasilkan. Enzim protease yang dihasilkan fase eksponensial sampai awal fase stasioner memiliki produksi yang optimal mengikuti pola kurva pertumbuhan (Kumara et al., 2012). Penelitian lain mengenai aktivitas enzim protease dari bakteri Rhizosfer memiliki produksi optimal pada masa inkubasi 48 – 72 jam terjadi pada fase eksponensial akhir dan stasioner awal (Fitriana & Asri, 2022).



Gambar 2. Pengamatan Zona Proteolitik

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata Indeks hidrolisis proteolitik terbesar yaitu pada isolat *GP sp. 4*, *GP sp.3* dan *GP sp. 1* dengan nilai masing- masing 1.533, 1.531, dan 1.500 termasuk dalam indeks hidrolisis proteolitik rendah. Indeks hidrolisis proteolitik dikategorikan tinggi jika nilai yang diperoleh lebih dari 3,1, sedangkan kategori sedang yaitu apabila 2,1- 3,1 dan kurang dari 2,1 dikategorikan hidrolisis rendah (Ahmad et al., 2013). Isolat bakteri proteolitik berpotensi dikembangkan apabila memiliki nilai indeks yang tinggi. Efektivitas suatu mikroorganisme dalam mengubah substrat bisa diukur dari daerah zona bening yang terbentuk di media tumbuhnya. Semakin besar daerah zona bening yang terbentuk menandakan mikroba tersebut memiliki kemampuan yang tinggi dalam mengubah substrat yang terkandung di dalam media tumbuhnya (Nurmalinda et al., 2013).

Ketersediaan nutrisi dan substrat merupakan salah satu faktor yang menentukan jumlah enzim yang disekresikan. Aktivitas protease akan terjadi seiring dengan autolisis sel akibat adanya akumulasi berbagai enzim dalam media pertumbuhan (Olajuyigbe, 2013). Semakin besar zona bening pada isolat bakteri proteolitik maka semakin besar pula potensi isolat tersebut dalam menghasilkan enzim protease (Yusmarini et al., 2009).

Pewarnaan Gram Bakteri Proteolitik dari *Ileum Gallus gallus*

Berdasarkan hasil pewarnaan gram, isolat bakteri proteolitik yang dikarakterisasi termasuk dalam golongan bakteri gram positif dan hanya satu yang termasuk kedalam golongan bakteri gram negatif, ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pewarnaan Bakteri Proteolitik dari *Ileum Gallus gallus*

No	Isolat	Pewarnaan gram
1.	GP sp. 1	Positif
2.	GP sp. 2	Positif
3.	GP sp. 3	Negatif
4.	GP sp. 4	Positif
5.	GP sp. 5	Positif
6.	GP sp. 6	Positif
7.	GP sp. 7	Positif
8.	GP sp. 8	Positif
9.	GP sp. 9	Positif
10.	GP sp. 10	Positif

Pewarnaan Gram Bakteri

Berdasarkan hasil pewarnaan gram, isolat bakteri proteolitik yang dikarakterisasi termasuk dalam golongan bakteri gram positif dan hanya satu yang termasuk kedalam golongan bakteri gram negatif, ditunjukkan pada Tabel 2. Sifat gram negatif dengan warna merah pada sel bakteri menurut Strohl *et al.*, 2001 disebabkan oleh dua faktor, yaitu lapisan peptidoglikon yang tipis satu sampai dua lapis dan kadar lipid yang tinggi 20%.

Bakteri Gram positif dapat berwarna ungu karena warna kristal violet-yodium tetap dipertahankan meskipun telah diberi larutan pemucat (alkohol), sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah karena zat warna tersebut larut pada saat pemberian alkohol dan pada akhirnya berubah menjadi warna merah setelah pemberian safranin. Perbedaan hasil dalam pewarnaan ini disebabkan perbedaan struktur kedua kelompok bakteri tersebut (Hidayat dan Alhadi, 2012).

Adanya perbedaan struktur dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif menyebabkan perbedaan reaksi dalam penyerapan zat warna. Sebagian besar dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari peptidoglikan, sedangkan dinding sel bakteri Gram negatif mempunyai kandungan lipida yang tinggi dibandingkan dinding sel bakteri Gram positif. Lipida dapat larut dalam alkohol sehingga pori-pori dinding sel membesar dan meningkatkan daya larut zat warna ungu pada dinding sel bakteri Gram negatif ketika pemberian kristal violet. Penambahan safranin pada tahap akhir inilah yang menyebabkan sel bakteri Gram negatif dapat berwarna merah, karena zat warna kristal violet-yodium terlarut oleh pemberian alkohol kemudian dinding sel mengikat zat warna kedua. Pada bakteri Gram negatif, penambahan safranin tidak menyebabkan perubahan warna karena zat warna ungu dari kristal violet-yodium tetap terikat pada dinding sel (Hidayat dan Alhadi, 2012).

Tabel 3. Hasil Uji katalase dan Uji Motilitas Bakteri Proteolitik

No	Isolat	Katalase	Motilitas
1.	GP sp. 1	+	+
2.	GP sp. 2	+	+
3.	GP sp. 3	+	+
4.	GP sp. 4	+	+
5.	GP sp. 5	+	+
6.	GP sp. 6	+	+
7.	GP sp. 7	+	+
8.	GP sp. 8	+	-
9.	GP sp. 9	+	+
10.	GP sp. 10	+	-

Uji Katalase dan Motilitas

Berdasarkan uji katalase, kesepuluh isolat bakteri proteolitik mampu menghidrolisis hidrogen peroksida dan sembilan isolat bersifat motil. Hasil uji katalase dan motilitas bakteri asam laktat dapat dilihat pada tabel 3 berikut ini. Kesepuluh isolat bakteri proteolitik memiliki kemampuan dalam menghidrolisis asam peroksida yang menunjukkan kesepuluh isolat ini memiliki karakteristik katalase positif. Reaksi katalase menunjukkan hasil positif bila terbentuk gelembung udara yang menandakan terbentuknya gas O₂ dan akan segera

membentuk suatu sistem pertahanan dari toksik H₂O₂ yang dihasilkannya (Utami et al., 2019). Penelitian lainnya, terdapat empat isolat bakteri proteolitik bersifat katalase positif yang ditemukan pada Terasi Cirebon (Munifah, 2014) dan empat isolat bersifat katalase positif yang ditemukan pada padang lamun (Rizaldi et al., 2018). Bakteri katalase positif akan memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂ dimana parameter yang menunjukkan adanya aktivitas katalase adalah adanya gelembung oksigen. Bakteri katalase negatif tidak menghasilkan gelembung sehingga H₂O₂ yang dipecah tidak menghasilkan oksigen H₂O₂ (Djide

& Wahyudin, 2008). Berdasarkan hasil uji motilitas, hanya dua isolat yang bersifat non-motil sedangkan selebihnya bersifat motil. Hal ini terlihat dengan ada tidaknya penjaran/jejak di sekitar tempat tusukan jarum ose. Motilitas merupakan kemampuan bakteri untuk bergerak sendiri dengan bantuan alat geraknya. Sifat motilitas pada bakteri dapat dilihat dari pertumbuhan yang menyebar di sekitar tempat tusukan kultur atau adanya sebaran putih seperti akar di sekitar inokulasi yang berarti bakteri tersebut memiliki flagela (Fardiaz, 1993). Menurut bakteri probiotik memiliki kemampuan biosintetik yang sangat terbatas, sehingga bersifat non-motil. Perolehan energi semata-mata tergantung pada metabolisme fermentasi yang dilakukan di tempatnya. Hasil negatif pada uji motilitas menunjukkan bahwa bakteri uji tidak memiliki flagela sebagai alat geraknya (Surono, 2004).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, rata-rata Indeks hidrolisis proteolitik terbesar yaitu pada isolat *GP sp. 4*, *GP sp.3* dan *GP sp. 1* dengan nilai masing- masing 1.533, 1.531, dan 1.500. Nilai indeks proteolitik kesepuluh isolat bakteri proteolitik ini tergolong rendah sehingga tidak berpotensi dijadikan sebagai agen probiotik pakan fermentasi unggas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan salah satu luaran hibah internal Universitas Pembangunan Panca Budi, Medan. Peneliti juga mengucapkan terima kasih kepada rekan – rekan dosen dan staff laboratorium LKPP Universitas Pembangunan Panca budi yang telah memfasilitasi bahan dan alat dalam penelitian.

REFERENSI

- Ahmad, B., Nigar, S., Shah, S.S.A., Bashir, S., Ali, J., Yousaf, S., & Bangash, J, A, 2013. *Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Municipal Waste and Their Screening for Potential Antimicrobial Activity. World Applied Scinces Journal*, 1420-1426.
- Asril, M & Leksikowati, S. S. 2019. Isolasi Dan Seleksi Bakteri Proteolitik Asal Limbah Cair Tahu Sebagai Dasar Penentuan Agen Pembuatan *Biofertilizer*. Elkawnie: *Journal Of Islamic Science And Technology* Vol. 5, No. 2
- Beski, A.S., Swick, S.M & Iji, P.A. 2015. Specialized protein products in broiler chicken nutrition. *Jurnal Animal Nutrition*. 1: 47-53.
- Djide, M.N & Wahyudin, E. 2008. Isolasi bakteri asam laktat dari ASI, dan potensinya dalam menurunkan kadar kolesterol secara in vitro. *Farmasi dan Farmakologi*, 12 (3):73-78.
- Fardiaz, S. 1993. Analisis Mikrobiologi Pangan. PT. King of GrafindoPersada. Jakarta.
- Hidayat, R. dan Alhadi, F. 2012. Identifikasi *Streptococcus Equi* dari Kuda yang diduga Menderita Strangles. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 17(3): 199-203.
- Karina, A.N., Hussain, D.R., Johanes, E & Nawir, N.H., 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik dari Saluran Pembuangan Limbah Industri Tahu. *Jurnal Biologi Universitas Hasanuddin*. 1: 1 – 8.
- Kumara, M., Kashyap, S.S.N., Vijay, R, Tiwari, R & Anuradha, M. 2012. Production and Optimization of Extra Cellular Protease from *Bacillus sp.* Isolated from Soil. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research* 3(2):564–569.
- Munifah, I. 2014. Isolasi, Selksi dan Identifikasi Bakteri Proteolitik serta Produksi Protease dari Terasi Cirebon. Prosiding Seminar nasional Inovasi Teknologi Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan PerikananV.
- Nurmalinda A., Periadnadi & Nurmiati. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Bakteri Indigenous Pemfermentasi dari Buah Durian (*Durio zibethinus Murr.*). *Jurnal Biologi Universitas Andalas* 2(1), 8-13.
- Olajuyigbe FM, 2013. Optimized Production and Properties of Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus subtilis* SHS-04 Grown on Groundnut (*Arachis hypogaea*) Meal. *Advances in Enzyme Research* 1(04):112
- Rahmawati, N.H.F. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik dari Feses Hewan Luwak. *Jurnal Biologi Universitas Negeri Yogyakarta*. 4: 1 – 8.

- Rizaldi, R., Setyantini, W.H & Sudarno. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik yang Berasosiasi dengan Lamun Enhalus acoroides di Pantai Bama, Taman Nasional Baluran, Situbondo, Jawa Timur. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 1: 12 –20.
- Saidah, A.N. 2014. Isolasi Bakteri Proteolitik Termofilik dari Sumber Air Panas Pacet Mojokerto dan Pengujian Aktivitas Enzim Protease. *Jurnal Biologi*. Pp: 1 – 10.
- Strohl WA, Rouse H, Fisher BD. 2001. *Microbiology*. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Surono, IS 2004. *Fermented Milk Probiotics and Health*. Jakarta: Tri CiptaKarya.
- Utami, J.L., Ekowati, C. N., Sumardi & Rosa, E. 2019. Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Biologi Indonesia XXV. Lampung
- Yusmarini, Indrati, R., Utami, T & Marsono, Y. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Proteolitik dari Susu Kedelai yang Terfermentasi Spontan. *Jurnal Natur Indonesia* 12(1), 28-33.