

## **Isolasi dan identifikasi bakteri pada sekum ayam petelur (*Gallus gallus domesticus*) sehat sebagai kandidat probiotik**

F. Hestiyani\*, dan A.E.T.H. Wahyuni

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281

\*email: febfina.hestiyani@mail.ugm.ac.id

### **ABSTRAK**

Keseimbangan bakteri pada saluran pencernaan ayam mampu mempengaruhi produktivitas telur. Probiotik memiliki peran dalam menjaga keseimbangan bakteri dalam saluran pencernaan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis bakteri pada sekum ayam petelur yang belpeluang sebagai kandidat probiotik. Sebanyak lima ekor ayam petelur sehat umur 20 minggu, dipelihara dalam kandang baterai tertutup digunakan untuk penelitian ini. Pengambilan sampel berasal dari sekum ayam petelur. Biak murni bersifat Gram positif yang diperoleh dilakukan uji biokimia dan fisiologi meliputi fennentasi karbohidrat, NaCl, urease, dan motilitas. Hasil isolasi bakteri diamati morfologi koloni yang ada yaitu koloni wama putih dan putih kekuningan. Setelah diuji biokimia dan fisiologis terdapat satu sampel yang menunjukkan mampu memfennetasi semua gula, dan uji fisiologis NaCl, urease, dan motilitas menunjukkan hasil negatif. Dali hasil biokemis dan fisiologis tersebut dapat disimpulkan sampel 4B merupakan bakteri *Enterococcus* sp.

Katakunci: Ayam petelur, sekum, probiotik

### **ABSTRACT**

Isolation and Identification of Bacteria in the Cecum of Healthy Laying Hens (*Gallus gallus domesticus*) as Probiotic Candidates. The balance of bacteria in the digestive tract of chickens can affect egg productivity. Probiotics have a role in maintaining the balance of bacteria in the digestive tract. This study aims to detennine the types of bacteria in the cecum of laying hens that have the potential as probiotic candidates. A total of five healthy laying hens aged 20 weeks, kept in closed batte1Y cages were used for this study. Samples were collected from the cecum of laying hens. Pure Gram-positive bactefia obtained were then subjected to biochemical and physiological tests including carbohydrate

fennentation, NaCl, urease, and motility. The results of bacterial isolation observed the morphology of existing colonies, namely white and yellowish white colonies. After biochemical and physiological tests, there was one sample that showed that it was able to fennent all sugars, and the NaCl physiological test, urease, and motility showed negative results. From these biochemical and physiological results, it can be concluded that sample 4B is *Enterococcus* sp.

Keywords: Laying hens, cecum, probiotic

## **PENDAHULUAN**

Ayam petelur merupakan salah satu hewan ternak yang menghasilkan produk dengan produktivitas tinggi. Produktivitas tersebut bergantung pada banyak hal, di antaranya kualitas dan kuantitas pakan, kandang, dan cara pemeliharaan. Kualitas pakan, kandang, dan cara pemeliharaan yang baik akan menghasilkan kualitas telur yang baik. Pemeliharaan ayam petelur diminati masyarakat karena produk yang dihasilkan berupa telur merupakan komoditas yang dibutuhkan masyarakat pada umumnya dan jenis ayam petelur yang banyak ditanakkan yaitu ayam ras petelur (Baruadi dkk, 2022). Mikroflora pada saluran pencernaan ayam baik petelur maupun broiler memiliki peran penting dalam menghasilkan telur yang baik. Salah satu cara untuk meningkatkan kualitas telur yaitu dengan menambahkan imbuhan probiotik pada pakan. Jenis bakteri yang sering digunakan sebagai starter probiotik diantaranya kelompok *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, dan *Streptococcus* (Sutrisna, 2014).

Perlu diketahui jenis probiotik dari organ pencernaan ayam petelur yang dapat digunakan

sebagai imbuhan pakan untuk diberikan pada ayam petelur itu sendiri. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui bakteri yang terdapat pada sekum ayam petelur sem mencari potensi bakteri probiotik pada sekum ayam petelur.

## **MATERI DAN METODE PENELITIAN**

Alat yang digunakan pada penelitian yaitu peralatan nekropsi, ose, rak tabung, anaerobic jar, mikroskop cahaya, tabung reaksi, autoclave, gelas objek, bunsen, inkubator, timbangan analitik, dan lemari pendingin.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Kabupaten Sleman, DI Yogyakarta. Penelitian menggunakan organ pencernaan sekum dari lima ayam petelur berrumur 20 minggu yang dipelihara dalam kandang baterai tertutup (closed house). Medium yang digunakan adalah medium padat dan Cair. Medium padat yang digunakan yaitu de Man Rogosa and Sharpe (MRS). Medium cair yang digunakan yaitu gula-gula berupa glukosa, sukrosa, galaktosa, trehalosi, mannitol, sorbitol, maltose, laktosa, NaCl, urea, serta pakan yang

digunakan adalah dengan proporsi yang disesuaikan dengan fase temak.

### **Persiapan dan pengambilan sampel**

Ayam layer dipotong, dikeluarkan darahnya dan diletakkan di atas nampan yang sudah disiapkan secara steril, kemudian disayat di bagian media ventral daerah abdomen sehingga otot dada dapat dilepas.

Pencernaan dikeluarkan dan bagian sekum diinsisi. Cawan petri yang berisi media padat MRS agar disiapkan, kemudian sampel dari lumen sekum diambil dengan jarum ose steril berukuran 2 mm dan ditanam pada cawan petri. Cawan petri kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 oc (Wood & Holzapfel, 1995). Pengelompokan koloni sesai morfologi koloni dominan.

Pada akhir masa inkubasi, koloni-koloni yang tumbuh pada pennaan medium diperiksa dengan seksama. Koloni dengan karaktefistik yang sama dikultur ulang pada media padat MRS agar. Pembagian morfologi koloni pada penelitian ini dibagi menjadi A yaitu koloni putih kompak dan B koloni putih kekuningan sesuai koloni yang tumbuh. Dicari koloni yang temsah pada hasil kultur ulang, koloni yang

terpisah ini adalah koloni yang terbentuk dari satu jenis sel. Media MRS diinkubasikan pada kondisi anaerob menggunakan anaerobic jar, selanjutnya diinku-basi dengan suhu inkubasi 370C selama 24 jam (Suardana dkk, 2007). Pengamatan morfologi koloni dan pewarnaan Gram

Pengamatan secara mikroskopik dilakukan untuk melihat bentuk dan warna dari sel bakteri. Morfologi koloni dilakukan melalui pengamatan bentuk koloni dan warna koloni pada media padat MRS agar. Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan teknik pewarnaan gram.

Kaca objek yang bersih disiapkan dan dipanaskan di atas bunsen selama beberapa detik. Ditetaskan akuades steril pada kaca objek. Biakan bakteri pada kaca objek dengan jarak antara kedua olesan kurang lebih 2 cm. Kaca objek difiksasi di atas bunsen hingga olesan kering.

Olesan bakteri digenangi/ditetesi dengan pewarna pfinder yaitu Kristal violet selama 1 menit, selanjutnya, olesan bakteri dicuci dengan air mengalir. Olesan kemudian digenangi/ditetesi larutan lugol gram selama 1 menit, kemudian dilakukan seperti langkah sebelumnya. Larutan alkohol sebagai

peluntur diteteskan pada olesan bakteri dan didiamkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir. Pewarnaan terakhir digunakan lanitan safranin dengan cara diteteskan pada olesan bakteri dan ditunggu selama 1 menit. Kaca objek kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Bakteri Gram positif sel benivarna ungu dan bakteri gram negatif apabila sel bervwarna merah (Harley and Prescott, 2002).

### **Uji fermentasi karbohidrat**

Pengujian gula-gula dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang mampu memfennentasi karbohidrat. Pengujian fennentatif ditandai dengan adanya pembahan warna dari warna ungu menjadi warna kuning. Penibahan warna yang terjadi menandakan bahwa bakteri ini membentuk asam dari fennentasi glukosa dan fermentasi sukrosa (Panjaitan et al., 2020)

Gula-gula yang digunakan yaitu glukosa, sukrosa, galaktosa, trehalosi, mannitol, sorbitol, maltose, laktosa. Tujuan dari uji ini adalah untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfennentasi gula. Cara keljanya, bakteri diambil menggunakan ose steril pada media koleksi dan dimasukkan ke dalam media glukosa, sukrosa, galaktosa,

trehalosi, mannitol, sorbitol, maltose, laktosa. Setelah itu media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji gula-gula bersifat positif apabila terlihat penibahan warna menjadi kekuningan dan negatif apabila wamanya tetap merah (Lay, 1994).

### **Uji Natrium Klorida**

Pengaruh pemberian konsentrasi kadar garam terhadap pertumbuhan bakteri dapat dilihat dari sampel bakteri yang diinkubasi selama 24-48 jam pada media MRS dengan variasi kadar NaCl 6,5% dan 18%. Hasil keruh menandakan sampel bakteli tersebut dapat tumbuh pada medium yang diberi NaCl (Tille, 2022).



Gambar I. Hasil peltumbuhan koloni sampel sekum 4B

### **Uji ureas**

Agar urea digunakan untuk menguji kemampuan bakteri dalam memproduksi urease. Satu usa biakan bakteri ditanam ke agar urea

dengan menggunakan metode goresan zig-zag. Media diinkubasi pada suhu 370C selama 18-24 jam (Tille, 2022).

#### Uji motilitas

Motilitas bakteri dapat diketahui dengan melakukan uji motilitas pada media agar semisolid. Biakan bakteri dari media MRS agar diambil menggunakan busa bermata lurus, kemudian ditusukkan lurus ke dalam media semisolid hingga sepeftiga basal tabung. Media diinkubasi pada suhu 370C selama 18-24 jam (Tille, 2022).

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Sampel penelitian diambil dari lima ekor ayam petelur sehat yang dipelihara di kandang baterai tertutup. Sebanyak lima ekor sekum yang digunakan sebagai sampel, dilakukan koloni dan morfologi sel selta untuk stok isolat uji biokimia selanjutnya. Hal ini dilakukan dengan mengambil koloni telpisah bakteli dali media MRS awal.

#### **Koloni yang tumbuh pada media**

MRS dari pengambilan sampel dengan cara swab pada sekum dan ditumbuhkan pada media MRS agar. Pada akhir masa inkubasi, koloni-koloni yang tumbuh pada pemmkaan medium diperiksa dengan seksama. Koloni dengan

karakteristik yang sama dikultur ulang pada media padat MRS agar. Pembagian morfologi koloni pada penelitian ini dibagi menjadi A yaitu koloni putih kompak dan B koloni putih kekuningan.

#### **Pengecatan Gram**

Pengecatan Gram dilakukan pada koloni telpisah hasil kultur ulang. Isolat yang menunjukkan hasil pengecatan Gram positif dilakukan replating ke media MRS bani. Tujuan dari replating adalah untuk klasifikasi berdasarkan pengamatan morfologi dioleskan pada gelas objek dan diwamai dengan pengecatan Gram. Pengecatan Gram dilakukan untuk mengetahui morfologi sel bakteri dan menentukan sel bakteri tennasuk Gram positif atau Gram negatif. Bakteri Gram positif akan tercat warna ungu karena bakteri Gram positif mengalami denaturasi protein pada dinding selnya akibat pencucian dengan alkohol. Protein menjadi padat, pori-pori mengecil dan penneabilitas dinding sel berkurang sehingga kristal violet yang bervwarna ungu dipeltahankan bakteri dan bakteri akan tetap berwarna ungu ( Kamplan dan Kaplan, 1932).

Bakteri Gram positif memiliki kandungan peptidoglikan lebih banyak pada dinding selnya

dibandingkan dengan bakteri Gram negatif (Calter dan Wise, 2004). Jika bakteri menunjukkan warna merah muda, maka bakteri tersebut dikelompokkan jenis bakteri Gram negatif (Hamidah et al., 2019). Hasil pengecatan sampel menunjukkan hanya sampel 4B dan 5B yang merupakan bakteri Gram positif. Sampel 4B dan 5B memiliki bentuk coccus tunggal dan tercatat ungu. Kedua sampel tersebut selanjutnya ditanam pada media-media uji biokemis dan fisiologis untuk identifikasi bakteri yang lebih spesifik. Kultur bakteri Gram negatif tidak dilakukan uji biokemis dan fisiologis lanjutan karena salah satu sifat bakteri kandidat probiotik adalah Gram positif.

### **Uji fermentasi karbohidrat**

Karbohidrat merupakan sumber karbon dan energi yang paling banyak digunakan dalam proses fermentasi. Karbohidrat sebagai sumber energi dimetabolisme melalui dua cara yaitu respirasi dan fermentasi. Fermentasi merupakan proses konversi gula menjadi asam atau alkohol dengan bantuan bakteri atau ragi. Fermentasi berlangsung dalam kondisi anaerobik atau tanpa adanya oksigen. Ciri-ciri bakteri asam laktat secara umum adalah selnya bereaksi positif

terhadap pewarnaan Gram, tidak memiliki enzim katalase dan tidak membentuk spora (Romadhon dkk, 2012). Hasil yang diperoleh dari uji gula-gula menunjukkan bahwa sampel ayam 4B dan SB dapat memfermentasi glukosa, sukrosa, galaktosa, mannitol, sorbitol, maltose, dan laktosa. Trehalosi hanya dapat difermentasi oleh sampel 4B, sedangkan sampel 5B tidak menunjukkan adanya perubahan. Indikasi kemampuan bakteri untuk memfermentasi adalah perubahan media yang semula pink menjadi kuning, sedangkan media pada bakteri yang tidak dapat memfermentasi tetap berwarna pink.

### **Uji natrium klorida**

Hasil uji sampel 4B dan SB menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media. Uji NaCl digunakan untuk melihat kemampuan organisme untuk tumbuh pada konsentrasi garam yang tinggi. Uji ini positif jika sampel menunjukkan pertumbuhan pada media dan negatif jika tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada media.

### **Uji urease**

Kedua sampel 4B dan SB menunjukkan hasil negatif dikarenakan media tetap berwarna kuning. Pengujian sampel dengan

cara ditumbuhkan di media agar miring urea dengan indikator phenol red berfungsi untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim urease. Urea yang terkandung dalam media akan diuraikan menjadi ammonia oleh enzim urease milik bakteri. Amonia yang memiliki sifat basa dapat meningkatkan pH sehingga warna media kan berubah menjadi merah (Leboffe dan Pierce, 2011).

**Uji motilitas**

Uji motilitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan motilitas bakteri (Leboffe dan Pierce, 2011). Uji motilitas menggunakan media agar tegak semisolid. Konsentrasi agar yang digunakan pada media rendah, sehingga menyebabkan bakteri yang bersifat motil dapat bergerak di dalam agar. Hasil positif pada bakteri yang bersifat motil ditunjukkan adanya peltumbuhan abkteri yang menyebar, sedangkan hasil negatif ditandai dengan peltumbuhan bakteri hanya pada bekas tusukan (Harley dan presscott, 2002). Sampel 4B dan 5B menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri, menjadikan hasil uji motilitas keduanya negatif.

**Identifikasi bakteri pada sampel**

Berdasarkan hasil identifikasi bentuk koloni, sifat pengecatan Gram, bentuk sel, uji katalase dari hasil analisis dan intelpretasi data di atas bahwa sampel sekum ayam 4B adalah suspect bakteli asam laktat genus *Enterococcus* sp. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (De Vos et al., 2009). Morfologi berbentuk coccus, tercat Gram+ dan katalase-. Berdasarkan karakter-karakter tersebut, maka bakteri yang telah diisolasi dari sekum ayam petelur tersebut kemungkinan tergolong genus *Enterococcus* sp. Hal ini sesuai diperkuat oleh Wood & Holzapfel (1995) bahwa *Enterococcus* mampu memfennentasi galaktosa, glukosa, laktosa, maltose, trehalosi, mannitol, sorbitol, dan sukrosa.

Tabel 1. Hasil identifikasi saluran pencernaan

Kol	Uji Biokemis											
	G l	Su l	G a	T a	M a	S o	Mal	L	NaC 16,6	NaCl 18%	U M	
Ayam 1	A											
	B											
Ayam 2	A											
	B											
Ayam 3	A											
	B											
Ayam 4	A											
	B	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Ayam 5	A											
	B	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Keterangan: Gl: Glukosa, Su: Sukrosa, Ga: Galaktosa, T: Trehalosi, Ma: Mannitol, So: Sorbitol, Mal: Maltosa, L: Laktosa, U: Urease, M: Motilitas

Enterococcus juga memiliki hasil uji motilitas negatif dan urease negatif. Menurut De Vos et al. (2009), mayoritas Enterococcus sp. resisten terhadap NaCl 6,5 0 0, namun terdapat beberapa spesies Enterococcus yang tidak tumbuh pada NaCl 6,5 0 0. Spesies tersebut diantaranya E. italicus, E. phoeniculicola, E. camelliae, dan E. asini. Sampel 5B tidak dipilih untuk menjadi kandidat probiotik karena sifatnya yang tidak mampu memfennentasi karbohidrat-karbohidrat tertentu. Menurut Coulibaly et al., (2008), bahwa BAL merupakan bakteri gram+ (Gram positif), berbentuk batang atau kokuş, bersifat nonmotil, mampu memproduksi asam laktat. Clemente (2012) menyatakan bahwa syarat utama strain yang dapat digunakan sebagai agensia probiotik yaitu memiliki resistensi terhadap asam dan empedu sehingga bakteri dapat mencapai intestine dan mamou menempel pada mukosa intestin. Syarat lain yang perlu dimiliki oleh bakteri probiotik adalah kemampuannya menghasilkan substansi antimikrobia sehingga mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen enterik. Berbagai jenis substansi antimikrobia yang dihasilkan oleh bakteri probiotik antara lain asam organik, hydrogen peroksida, diasetil dan diperkirakan juga bakteriosin yaitu protein atau

polipeptida yang memiliki sifat anti bakteri (Suskovic et al. 2010).

## **KESIMPULAN**

Hasil isolasi dan identifikasi bakteri di sekum ayam petelur ditemukan karaktelistik bakteri yang memenuhi syarat kandidat probiotik, yaitu Gram positif, berbentuk coccus, dapat memfennentasi glukosa, sukrosa, galaktosa, trehalosi, maltosa, sorbitol, mannitol, laktosa, urease negatif, dan motilitas negatif. Karaktefistik tersebut merupakan karakteristik bakteri Enterococcus sp.

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Bamadi, Y., Sompie, F.N., Imbar, M.R., Bagau. B. 2022. Perfonna ayam dara ras petelur yang diberikan sumber kalsium fosfor berbeda dalam ransum. *Zootec.* 42(2): 441-449
- Calter, G.R. dan Wise, D.J. 2004. *Essential Of Veterinary Bacteriology and Illyco/ogv Sixth Edition.* Iowa: Iowa State Press
- Clemente, A. 2012. Probiotics and Prebiotics: An Update from the World Gastrointestinal Organization (WGO). *Eur Food Res Rev.* 2(1): 24-28
- Coulibaly I., Dauphin, R.B., Destain J., Philippe T, 2008. Characterization of Lactic Acid Bacteri Isolated from Poultry Farms in Sinegal. *African Journal Biotechnologv.*7(12): 2-12

- De vos, P., Ganity, GM., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K., Whitman, W.B. 2009. *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes*. USA: Springer
- Hamidah, M.N., Rianingsih, L., Romadhon. 2019. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Dali Peda dengan Jenis Ikan Berbeda terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*. I (2): 11-21
- Harley, J.P dan Prescott, L.M. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology Fifth Edition*. New York: The MC-Graw Hill Companies
- Kamplan, M. L. dan L. Kaplan. 1932. *The Gram Stain Differential Staining*. Bureau of Laboratories. New York: Depafiement of Health Lay,
- B. W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakalta: PT Raja Grafindo Persada
- Leboffe, M.J. dan Pierce, B.E. 2011. *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory 4 Edition*. Colorado: Morton Publishing
- Panjaitan, F.J., Bachtiar, T., Arsyad, I., Lele, O.K., Indriyani, W. 2020. Karakterisasi Mikroskopis dan Uji Biokimia Bakteli Pelamt Fosfat (BPF) dari Rhizosfer Tanaman Jagung Ease Vegetatif. *Jurnal Ilmu Pertanian dan Lingkungan*. 1(1): 9-17
- Romadhon, Subagiyo, Margino S. 2012. Isolasi dan Karaktefisasi Bakteri Asam Laktat dari Usus Udang Penghasil Bakteriosin sebagai Agen Antibakteria pada Produk-produk Hasil Pefikanan. *Saintek Perikanan*. 8(1): 61-66
- Suardana, I W., Suarsana, I.N., Sujaya, LN., Wilyawan, K.G. 2007. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Cairan Rumen Sapi Bali sebagai Kandidat Biopresewatif. *Jurnal Veteriner*. 8(4): 155 159
- Suskovic, J., KOS, B., Beganovic., Pavunc, A.L., Habjanic, K., Matosic, S. 2010. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria. *Food Technol. Biotechnol*. 48(3): 296-307
- Sutrisna, R. 2014. Isolat Bakteri Asam Laktat Sebagai Probiotik Dengan Vaksinasi AI Dan ND Dalam Pembentukan Titer Antibodi Dan Bobot Badan Ayam Jantan Tipe Medium. Lampung. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*. 14 (2): 124-133
- Tille, P.M. 2022. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Missouri: Elsevier
- Wood, B.J.B. clan Holzapfel, W.H.1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. UK: Spfinders