

## **Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Asam Laktat Usus Itik (*Anas Domestica*) Pada Bakteri Gram Positif Dan Pola Pertumbuhan Isolat Bakteri Usus Itik Pada Media Mrs Broth**

### ***Inhibition Test of Bacterial Isolates Gut Duck (*Anas Domestica*) on Gram Positive Bacteria and Growth Patterns Isolates on Media Mrs Broth***

**Rudy Sutrisna<sup>1</sup>, Nugroho Ekowati<sup>2</sup>, dan Diah Rahmawati<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Unila

<sup>2</sup>Jurusan Biologi Fakultas MIPA Unila

<sup>3</sup>Mahasiswa Biologi Fak. MIPA Unila

Jln. Soemantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung

#### **ABSTRACT**

*At this time unknown bacterial isolates inhibit the ability of the isolated intestine of ducks against Gram-positive bacteria such as *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. In addition, the growth pattern is also unknown bacterial isolates grew on the medium MRS Broth. This study aims to determine the inhibition of intestinal bacterial isolates antibacterial extract of duck against Gram-positive bacteria and determine the pattern of growth of intestinal bacteria duck isolates were selected on MRS Broth media. Determination of the inhibition assay duck intestine bacterial isolates using the wells, while for the determination of growth patterns of duck intestine bacterial isolates by counting directly the number of bacterial cells by microscopy. The results showed that the bacterial isolates capable of inhibiting the growth of colon duck Gram-positive bacteria. Isolates that produce the greatest diameter of the results of this research that isolates B4 and B9 at 20.2 mm and 17.9 mm long production time 4 days. Growth of intestinal bacteria isolates duck B4 shows the phase lag for 2 hours and logarithmic phase for 17 hours, while isobat B9 shows the phase lag for 3 hours and logarithmic phase for 10 hours.*

*Keywords: Intestinal Bacterial Isolates Ducks, Inhibition Power Test, Growth Patterns, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis**

Diterima: 30-09-2012, disetujui:

#### **PENDAHULUAN**

Saluran pencernaan unggas merupakan tempat hidup bagi mikroflora yang dibentuk setelah dilahirkan. Mikroflora indigenous dewasa akan menjadi *carrier* (pembawa) koloni mikroorganisme patogen seperti *Salmonella* dan *E. Coli*. Sedangkan mikroflora yang menyokong kesehatan unggas terdiri atas berbagai macam spesies mikroorganisme, seperti *Lactobaccilus*, *Bifidobacterium* dan

*Bacteroides* yang sebagian besar merupakan mikroorganisme yang dominan. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* dan *Bacteroides* dapat diisolasi dan dipreparasi sebagai probiotik. Penggunaan probiotik dapat mempengaruhi keberhasilan produksi mikroflora kompetitif dalam menyerang bakteri patogen pada unggas (Anggorodi, 1995).

Fuller (1991) menjelaskan bahwa bakteri probiotik harus memiliki persyaratan, antara lain memberikan efek yang menguntungkan pada *host*, tidak patogenik, tidak toksik, mengandung sejumlah besar sel hidup, mampu bertahan dalam kondisi yang tidak menguntungkan, dan melakukan kegiatan metabolisme dalam usus. Beberapa *Lactobacillus* yang biasa dijadikan probiotik, antara lain *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. casei* Shirota, *Lactobacillus* GG, dan *L. plantarum* 299 (Young, 1998). Napitupulu (2000) melaporkan bahwa *Lactobacillus* menghasilkan antibakteri. Filtrat *Lactobacillus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen Gram positif, seperti *Streptococcus* dan *Staphylococcus aureus*, serta bakteri Gram negatif, seperti *Escherchia coli*. Pada penelitian Abun (2008) diketahui bahwa *Lactobacillus* yang terdapat dalam usus broiler dapat menghambat kolonisasi bakteri Gram negatif *Salmonella*. Menurut Nester *et al.*, (2009) mekanisme aksi antimikroba ada 4 cara, yaitu dengan menghambat sintesis dinding sel, sintesis protein, sintesis asam nukleat, dan jalur metabolisme utama. Bakteriosin mencegah sintesis peptidoglikan yang utuh, sehingga dinding sel akan melemah dan akibatnya sel bakteri akan mengalami lisis. Selain itu, bakteriosin yang menyelubungi sel mikroba target akan masuk melalui membran sel mikroba target mengakibatkan ketidakseimbangan fungsi membran sitoplasma (mempengaruhi sintesa energi dan permeabilitas), menghambat sintesa asam nukleat dan protein, serta mengubah mekanisme translator sel.

Penelitian ini bertujuan untuk; (1) mengetahui daya hambat ekstrak antibakteri isolat bakteri usus itik terhadap bakteri Gram positif, (2) mengetahui perbedaan besarnya diameter daya hambat ekstrak antibakteri isolat bakteri usus itik terhadap bakteri Gram positif, (3) mengetahui pola pertumbuhan isolat bakteri usus itik yang terpilih (terbesar diameter daya hambatnya) pada media MRS *Broth*.

## METODE

**Tempat dan Waktu Penelitian.** Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2011 hingga Agustus 2011.

**Alat dan Bahan.** Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mikroskop, tabung reaksi, gelas objek, tabung anaerobic jar, cawan petri dengan diameter 15 dan 30 cm, erlenmeyer (ukuran 500 ml, 250 ml, 100ml dan 50 ml), gelas ukur, ose, spatula, bunsen, voertex mixer, neraca analitik, kompor listrik, autoklaf, *laminar air flow*, inkubator dengan suhu 37°C, mikrotube, tip, mikropipet, pH meter, pipet tetes, dan peralatan lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan adalah isolat bakteri usus itik (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12 dan B13) isolate koleksi (Sutrisna, 2010) dan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* koleksi Laboratorium Mikrobiologi MIPA Unila, media *deMan Rogosa and Sharpe* (MRS) *Broth*, media *Nutrient Broth* (NB), *bacteriological agar*, aquades, alumunium foil, kasa, kapas, minyak imersi (deMan, *et al.*, 1960).

### Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan 2 tahap. Tahap pertama, penentuan uji daya hambat dengan menggunakan metode difusi antibiotik sumuran. Kemampuan zat antibakteri ditentukan berdasarkan

diameter daya hambat yang dihasilkan. Tahap kedua, yaitu penentuan pola pertumbuhan isolat bakteri usus itik dengan menghitung langsung jumlah sel bakteri selama 24 jam dengan interval waktu 1 jam.

### **Prosedur Kerja**

#### **Peremajaan Bakteri**

Isolat bakteri usus itik dibiakkan dengan cara digores pada media MRS agar miring, lalu diinkubasi pada anaerobic jar selama 48 jam. Sedangkan untuk bakteri uji, dibiakkan dengan cara digores pada NA miring.

#### **Pembuatan Starter**

Isolat yang telah diinkubasi dari peremajaan, masing-masing diambil 1 ose, lalu dimasukkan ke dalam 12 ml MRS *Broth* steril, kemudian diinkubasi lagi selama 48 jam. Hasil inkubasi ini digunakan sebagai starter.

#### **Produksi Senyawa Antibakteri**

Sebanyak 10% dari starter diambil dan dimasukkan ke dalam 10,8 ml MRS *Broth* steril, kemudian diinkubasi selama 2 hari. Setelah 2 hari masa inkubasi, setiap harinya diambil kultur sebanyak 1 ml, lalu dimasukkan ke dalam microtube lalu sentrifuge. Kemudian kultur disentrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dari sentrifuge merupakan ekstrak antibakteri yang diduga mengandung senyawa antibakteri yang dapat menghambat bakteri Gram positif.

#### **Uji Daya Hambat Antibakteri**

Bakteri uji diinokulasi sebanyak 1 ose ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril, sampai diperoleh kekeruhan yang sama dengan StandarMac Farlan ( $3 \times 10^8$  CFU/ml). Kemudian, 1 ml bakteri uji dimasukkan ke dalam cawan petri steril dan ditambahkan 25 ml media NA steril. Lalu cawan petri diputar sesuai angka delapan sebelum media NA memadat, agar bakteri menyebar rata pada media. Setelah media memadat, di dalam media dibuat lubang membentuk sumur dengan diameter 1 cm. Larutan antibakteri dimasukkan ke dalam sumur sebanyak 100  $\mu$ l. Lalu kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian, diameter daya hambat diukur sesuai dengan garis yang telah dibuat.

#### **Perhitungan Sel Bakteri Secara Langsung (Mikroskopis)**

Perhitungan bakteri dilakukan secara langsung menggunakan mikroskop dengan cara mengambil 1 ose isolat bakteri usus itik yang telah dihomogenkan, kemudian diletakkan di atas gelas objek yang berukuran 1 cm x 1 cm dan dilakukan pengecatan gram. Perhitungan kepadatan sel bakteri secara langsung, dilakukan dengan cara melihat jumlah sel pada luas lapang pandang mikroskop. Penentuan luas lapang pandang mikroskop menggunakan diameter areal pandang mikroskop dengan mikrometer objektif yang mempunyai skala terkecil 0,01 mm. Setelah nilai diameter areal pandang mikroskop diketahui, kemudian dibagi 2 untuk mencari jari-jari dan dimasukkan ke dalam rumus berikut :

$$\text{Luas areal pandang mikroskop} = \frac{\pi r^2 \text{ mm}^2}{\pi r^2 \times 10^{-2} \text{ cm}^2}$$

r merupakan jari-jari areal pandang mikroskop dalam cm, sedangkan rumus penentuan perhitungan kepadatan sel bakteri secara langsung yaitu sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi sel} = \frac{\bar{x}}{\text{Luas lapang pandang mikroskop (cm}^2\text{) x t (cm)}}$$

Keterangan =  $\bar{x}$ : rata-rata jumlah bakteri dan t : tinggi

Setelah dilakukan perhitungan sel, dilanjutkan dengan menghitung waktu generasi sel bakteri agar dapat mengetahui kecepatan sel bakteri dalam membelah. Rumus dalam menentukan waktu generasi sel yaitu sebagai berikut :

$$N_t = N_0 2^n$$

N<sub>t</sub>: jumlah sel akhir,

N<sub>0</sub>: jumlah sel awal, n: jumlah generasi

$$\text{Waktu generasi} = t / n$$

t: waktu pertumbuhan eksponensial, n: jumlah generasi

Dalam bentuk logaritma, rumus  $N_t = N_0 2^n$  menjadi:

$$\log N_t = \log N_0 + n \log 2$$

$$\log N_t - \log N_0 = n \log 2$$

$$n \log 2 = \log N_t - \log N_0$$

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2}$$

$$\log 2 = 0,301$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Daya Antibakteri

Besar diameter daya hambat yang terbentuk oleh ekstrak antibakteri dari masing-masing isolat bakteri usus itik terhadap *B. subtilis* dan *S. aureus* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Diameter daya hambat ekstrak antibakteri isolat bakteri usus itik terhadap *B. subtilis* dan *S. aureus*

Ekstrak anti-bakteri	Diameter Daya Hambat (mm)							
	<i>B. subtilis</i>				<i>S. aureus</i>			
	Pengulangan			Rata-rata	Pengulangan			Rata-rata
	1	2	3		1	2	3	
B2	8.0	6.8	0.0	4.9	15.6	25.0	10.0	16.9**
B3	9.3	7.7	6.7	7.9	10.0	19.0	23.0	17.3**
B4	10.3	21.0	29.3	20.2***	13.3	13.3	14.7	13.8**
B5	10.0	10.0	11.3	10.4**	12.0	11.3	10.0	11.1**
B6	8.3	10.7	15.0	11.3**	11.0	11.3	12.7	11.7**
B7	9.3	11.7	0.0	7.0	11.0	11.0	0.0	7.3
B8	10.7	13.3	25.7	16.6**	11.7	11.7	0.0	7.8
B9	19.3	14.7	10.7	14.9*	13.0	20.3	20.3	17.9**
B10	14.3	16.0	21.7	17.3**	14.7	15.7	17.3	15.9**
B11	9.3	9.3	15.0	11.2**	10.0	10.0	9.7	9.9*
B12	7.0	11.0	16.7	11.6**	12.7	13.7	16.0	14.1**
B13	11.7	13.3	19.7	14.9**	13.0	10.0	9.3	10.8**

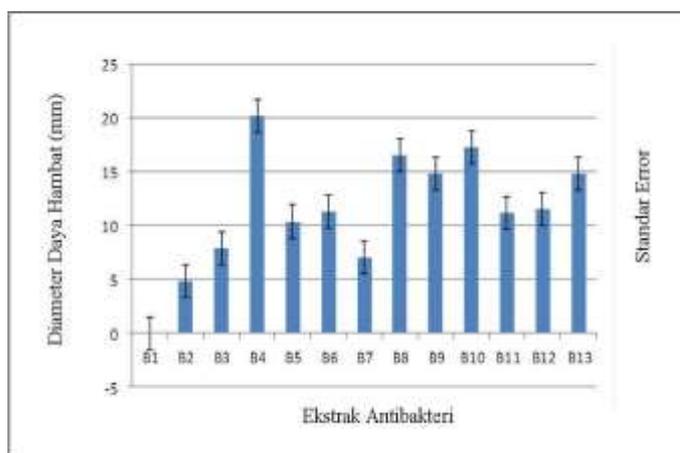
Keterangan :

\* : Potensi antibakteri “sedang” (8,5-10 mm)

\*\* : Potensi antibakteri “kuat” (10,2-20 mm)

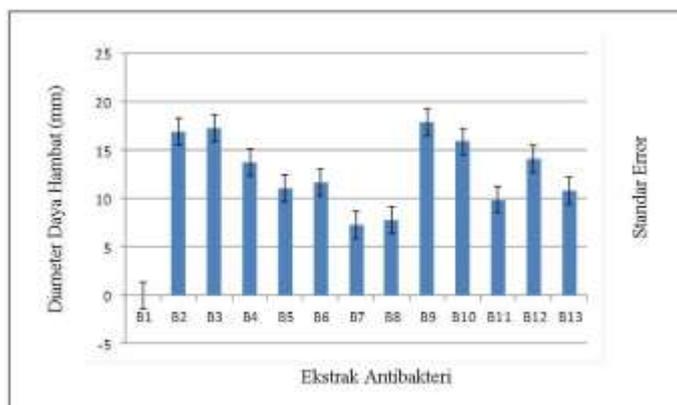
\*\*\* : Potensi antibakteri “sangat kuat” (>20 mm) (Hasim, 2003)

Pada Tabel 2 terlihat 12 ekstrak antibakteri mengakibatkan terbentuknya diameter daya hambat terhadap *B. subtilis* dan *S. aureus*. Ekstrak antibakteri yang memiliki diameter terbaik pada *B. subtilis* yaitu B4 sebesar 20,2 mm dan pada *S. Aureus*, yaitu B9 sebesar 17,9 mm. Hasil analisis dengan menggunakan standar error pada *B. subtilis* menunjukkan bahwa masing-masing ekstrak antibakteri isolat bakteri usus itik, pada umumnya memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam menghasilkan diameter daya hambat. Namun, jika dikelompokkan berdasarkan tingkat standar error, maka daya hambat dari yang besar ke yang kecil terdapat 5 kelompok ekstrak antibakteri yang memiliki kemampuan daya hambat yang sama satu sama lain. Kelompok pertama, yaitu B4 dan B10, kelompok ke-2, yaitu B8, B9, B10 dan B13; kelompok ke-3, yaitu B5, B6, B11, dan B12; kelompok ke-4, yaitu B3 dan B5; serta kelompok ke-5, yaitu B2 dan B7.



Gambar 7. Histogram diameter daya hambat ekstrak antibakteri isolat bakteri usus itik terhadap *B. Subtilis*

Sama halnya pada histogram diameter daya hambat ekstrak antibakteri isolat bakteri usus itik terhadap *S. Aureus*, jika diurutkan berdasarkan tingkat standar error dari yang besar ke yang kecil terdapat 5 kelompok ekstrak antibakteri yang memiliki kemampuan daya hambat yang sama satu sama lain. Kelompok pertama, yaitu B2, B3, B9, dan B10; Kelompok ke-2, yaitu B4, B10 dan B12; Kelompok ke-3, yaitu B4, B6, dan B12; Kelompok ke-4, yaitu B5, B6, B11, dan B13; serta kelompok ke-5, yaitu B7, B8, dan B11.



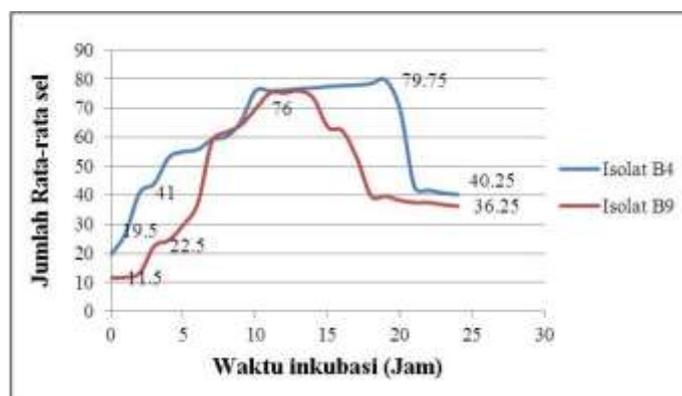
Gambar 8. Histogram diameter daya hambat ekstrak antibakteri isolat bakteri usus itik terhadap *S. aureus*

Sebanyak 13 isolat bakteri usus itik mempunyai ciri Gram positif, berbentuk batang, tidak membentuk spora, katalase negatif, motil, anaerob, dan dapat tumbuh dalam media MRS *Broth*. Ciri isolat tersebut menunjukkan bahwa 13 isolat merupakan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat mampu menghasilkan asam organik, seperti asam laktat, asam asetat, dan asam butirrat. Asam-asam organik tersebut dalam lubang sumuran yang berdifusi masuk ke dalam media tumbuh bakteri uji, dapat mengganggu keutuhan membran sel bakteri. Kerusakan membran sel mengakibatkan nutrisi yang dibutuhkan bakteri uji untuk tumbuh tidak dapat diabsorpsi sehingga proses metabolisme tidak berjalan dan pertumbuhannya akan terhambat, maka terbentuklah zona hambat.

Dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji, bakteri asam laktat tidak hanya menghasilkan asam laktat dan asam asetat (asam organik), tetapi juga senyawa-senyawa lain yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain. Senyawa tersebut diantaranya  $H_2O_2$  diasetil dan bakteriosin (Daeschel, 1989). Bakteriosin merupakan zat antimikroba berupa polipeptida, protein, atau senyawa yang mirip protein. Bakteriosin mencegah sintesis peptidoglikan yang utuh, sehingga dinding sel akan melemah dan akibatnya sel bakteri akan mengalami lisis. Selain itu, target utama dari bakteriosin, yaitu membran sitoplasma dengan cara mengubah permeabilitasnya, sehingga transport membran terganggu dan akibatnya produksi energi dan biosintesis protein terhambat (Nissen-Meyer *et al.*, 1992).

#### Pola Pertumbuhan Isolat Bakteri Usus Itik

Berdasarkan hasil uji pertumbuhan pada media MRS *Broth* disajikan pada gambar berikut.



Gambar 9. Pertumbuhan isolat bakteri B4 dan B9 selama 24 jam

Berdasarkan data yang diperoleh, dapat diketahui bahwa kedua isolat B4 dan B9 mengalami masa fase lag dan logaritmik yang berbeda. Pada isolat B4 fase lag dimulai dari jam ke-0 (nol) dengan jumlah rata-rata sel bakteri 19,50 selama 2 jam, kemudian berakhir dengan jumlah rata-rata sel bakteri 41. Sedangkan pada isolat B9 berlangsung selama 3 jam, dimulai dari jumlah rata-rata sel bakteri 11,50 dan berakhir dengan jumlah rata-rata sel bakteri 22,50. Fase lag merupakan fase bakteri melakukan adaptasi dengan lingkungannya. Pada saat itu sel mengalami perubahan komposisi kimiawi dan ukuran, serta bertambahnya substansi intraseluler sehingga untuk membelah diri.

Akhir dari fase lag merupakan awal dari fase logaritmik. Pada fase logaritmik bakteri telah dapat beradaptasi dengan lingkungannya, sehingga laju pertumbuhan bakteri sangat cepat. Sel membelah diri dengan laju yang konstan, sehingga massa menjadi dua kali lipat. Fase logaritmik pada isolat B4 dimulai dari jam ke-2 dengan jumlah rata-rata sel bakteri 41 dan berakhir pada jam ke-19 dengan jumlah rata-rata sel bakteri 79,75. Sedangkan pada isolat B9 dimulai dari jam ke-3 dengan jumlah rata-rata sel bakteri 22,50 dan berakhir pada jam ke-13 dengan jumlah rata-rata sel bakteri 76.

Selanjutnya, kedua isolat tersebut mengalami fase kematian akibat penumpukan racun dan habisnya nutrisi, sehingga mengalami penurunan jumlah rata-rata sel secara eksponensial yang mencapai 40,25 untuk isolat B4 dan 36,25 untuk isolat B9.

Dalam proses pertumbuhan sel bakteri diperlukan waktu untuk membelah diri dari satu sel menjadi dua sel sempurna, waktu tersebut disebut waktu generasi. Berdasarkan hasil perhitungan waktu generasi isolat B4 dan B9, diketahui bahwa isolat B4 memiliki waktu generasi  $12 \text{ Jam/Generasi}$ , sedangkan isolat B9 memiliki waktu generasi  $6 \text{ Jam/Generasi}$ . Hasil tersebut menunjukkan bahwa isolat B4 yang mempunyai masa fase lag lebih pendek, dan fase logaritmik lebih lama, ternyata hanya mampu menghasilkan rata-rata 1 generasi sel dengan nilai  $n = 0,960$  selama 12 jam. Berbeda dengan B9 yang mempunyai masa fase lag lebih lama, dan fase logaritmik lebih pendek, ternyata mampu menghasilkan rata-rata 2 generasi sel dengan nilai  $n = 1,757$  selama 6 jam.

## KESIMPULAN

1. Isolat bakteri usus itik mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*.
2. Besarnya diameter daya hambat isolat bakteri usus itik berbeda-beda. Berdasarkan hasil analisis histogram dengan standar error, isolat yang menghasilkan diameter terbesar pada *B. subtilis*, yaitu B4 dan pada *S. aureus* yaitu B9.
3. Pertumbuhan isolat bakteri usus itik B4 menunjukkan fase lag selama 2 jam dan fase logaritmik selama 17 jam, sedangkan isolat B9 menunjukkan fase lag selama 3 jam dan fase logaritmik selama 10 jam.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat dilaksanakan karena dukungan dana HIBAH BERSAING tahap pertama tahun anggaran 2012. Atas dukungannya kami ucapkan terimakasih.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abun. 2008. *Hubungan Mikroflora Dengan Metabolisme Dalam Saluran Pencernaan Unggas Dan Monogastrik*. Universitas Padjadjaran : Jatinangor
- Anggorodi, R. 1995. *Nutrisi Aneka Ternak Unggas*. Gramedia Pustaka Utama: Jakarta
- Daeschel, M., A. 1989. *Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservation*. J Food Technol 43: 148-155.
- deMan, JC, M. Rogosa, and ME Sharpe. 1960. *A medium for the cultivation of lactobacilli*. J. Bacteriol.: 23 130
- Fuller R. 1991. *Probiotic The Scientific Basis*. Chapman and Hall : London
- Hasim. 2003. Menanam Rumput, Memanen Antibiotik. *Jakarta : Kompas No. 127. Tahun ke-39*  
58 Volume 13, Nomor 1, Januari 2013

- Napitupulu, N., T. Yulinery, dan R. Hardiningsih. 2000. *Pengaruh Lama Penyimpanan, Suhu dan Media terhadap Kemampuan Antibakteri yang Dihasilkan Lactobacillus dalam Menghambat pertumbuhan Beberapa Bakteri Patogen*. Bogor: Proyek penelitian Pengembangan dan Pendayagunaan Biota Darat, Pusat Penelitian Biologi LIPI.
- Nester. Eugene W, Anderson. Dennis G, Roberts. C evans Jr, Nester, Martha T. 2009. *Microbiology a Human Perspective 6<sup>th</sup> Edition*. McGraw-Hill : New York
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Håvarstein, L. S., Sletten, K. & Nes, I. F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J Bacteriol* 174, 5686–5692.
- Sutrisna, R., S. Nurjanah. 2010. *Isolasi non-starch Polysacharides sebagai Prebiotik dan Bakteri sebagai Probiotik dalam Sistem Pencernaan Itik*. Laporan Penelitian Hibah Bersaing Tahun 2010. Fakultas Pertanian Universitas Lampung Bandar Lampung
- Young, J. 1998. European market developments in prebiotic- and probiotic-containing foodstuffs. *British J. Nutr.* 80. *Suppl.* 2, S231-S233.