

ISOLASI *Bacillus* PENGHASIL SELULASE DARI SALURAN PENCERNAAN AYAM KAMPUNG

Sumardi^{1*}, Christina Nugroho Ekowati¹ dan Dwi Haryani²

¹Jurusan Biologi FMIPA Unila, Jl. S. Brojonegoro No.1, B. Lampung 35145

²Mahasiswa PS Biologi Jurusan MIPA FKIP Unila, Jl. S. Brojonegoro No.1, B. Lampung 35145

E-mail: sumardi_bio@yahoo.co.id

Diterima 17 November 2009, disetujui untuk diterbitkan 9 Januari 2010

ABSTRACT

This research aims to know the presence and characterization of bacteria of *Bacillus* which produce cellulase in the alimentary canal of village chicken. The samples were taken from the food which has been softened in the proventriculus, gizzard, ampela, and food nutrients in the small intestine and feces from colon. The result showed that the bacterium isolated was *Bacillus* sp AIS-1 which has the highest cellulotic index, which is 480. However, the enzyme activity test showed that no cellulase enzymatic activity was found when it was growth in CMC broth media.

Keywords: cellulase, chicken village, *Bacillus* sp AIS-1

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan bakteri *Bacillus* penghasil selulase pada saluran pencernaan ayam kampung dan karakterisasinya. Sampel diambil dari pakan yang telah mengalami pelunakan di proventrikulus, tembolok, ampela, sari-sari makanan dari usus halus dan kotoran yang berasal dari usus besar ayam kampung. Hasil isolasi menunjukkan terdapat bakteri *Bacillus* sp AIS-1 yang memiliki indeks selulolitik paling tinggi yaitu sebesar 480. Namun dari hasil uji aktivitas enzimnya ternyata tidak ditemukan aktivitas enzim selulase ketika ditumbuhkan dalam media CMC broth.

Kata kunci: selulase, ayam kampung, *Bacillus* sp AIS-1

1. PENDAHULUAN

Untuk meningkatkan produktivitas ternak terutama ayam kampung, akhir-akhir ini banyak para peternak yang menggunakan bahan pakan imbuhan dan zat pemacu tumbuh. Bahan pakan imbuhan yang sering digunakan oleh para peternak biasanya berasal dari kelompok antibiotik¹⁾. Penggunaan antibiotik sebagai bahan pakan ternak dapat meningkatkan efisiensi pakan dan reproduksi ternak. Namun, akhir-akhir ini penggunaan antibiotik sebagai pakan ternak mulai dikurangi, bahkan di beberapa negara penggunaan antibiotik untuk pakan ternak mulai dilarang. Hal ini disebabkan karena kemungkinan adanya residu dari antibiotik akan menjadi racun bagi konsumen, yaitu dengan menciptakan bakteri patogen yang resisten dalam tubuh ternak. Selain itu antibiotik dapat membunuh semua bakteri yang terdapat di dalam saluran pencernaan ayam, baik bakteri yang menguntungkan maupun yang merugikan.

Oleh sebab itu para pakar nutrisi mengalihkan penggunaan antibiotik untuk pakan ternak, dan merekomendasikan kepada peternak untuk menggunakan probiotik sebagai bahan pakan ternak. Probiotik adalah bahan pakan imbuhan alami berupa mikroba hidup yang mampu meningkatkan proses pencernaan di dalam saluran pencernaan. Probiotik tergolong dalam jenis makanan fungsional, dimana bahan makanan ini mengandung komponen-komponen yang dapat meningkatkan kesehatan ternak dengan cara memanipulasi komposisi bakteri yang ada didalam saluran pencernaan ternak. Probiotik merupakan organisme dan substansi yang memiliki kontribusi pada keseimbangan mikroba dalam saluran pencernaan^{1,2)}. Bakteri probiotik berfungsi menjaga keseimbangan komposisi mikroorganisme dalam saluran pencernaan dengan cara mengurangi bakteri patogen dalam usus serta menstimulasi respon kekebalan, sehingga dapat meningkatkan daya cerna dan menjaga kesehatan^{2,3)}.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri penghasil selulase dari saluran pencernaan ayam kampung yang berpotensi sebagai probiotik.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri kandidat probiotik penghasil enzim selulase dilakukan dengan mengambil Masing-masing kotoran sebagai sampel diambil dari saluran pencernaan ayam kampung sebanyak satu gram lalu dipanaskan di dalam oven selama 15 sampai 30 menit pada suhu 80°C dengan maksud agar mendapatkan spora bakteri. Kemudian masing-masing sampel diinokulasikan pada media cair diperkaya yang mengandung CMC (*carboxy methyl cellulose*) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Selanjutnya kultur bakteri yang telah diinkubasi diambil sebanyak 1 ml untuk dilakukan pengenceran secara serial berturut – turut yaitu dari pengenceran 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, dan 10⁻⁴. dalam media diperkaya dimasukkan ke dalam 9 ml akuades kemudian dihomogenkan dengan *vortex mixer*. Pengenceran ini merupakan pengenceran 10⁻¹, kemudian suspensi dari pengenceran 10⁻¹ diambil sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi lainnya yang juga berisi 9 ml akuades lalu dihomogenkan. Pengenceran ini merupakan pengenceran 10⁻² begitu seterusnya, hingga pengenceran 10⁻⁴. Dari pengenceran 10⁻², 10⁻³ dan 10⁻⁴ masing-masing diambil 1 ml kemudian diinokulasikan pada media yang mengandung CMC (pepton 1 g, *beef* ekstrak 0,6 g, aquades 1000 ml, CMC 5 g, dan agar 15 g) dengan metode *pour plate*. Setelah diinkubasi 24 jam, masing-masing kultur ditetesi dengan larutan *congored*, dan koloni yang membentuk zona jernih menunjukkan selulolitik positif. Selanjutnya diukur luas zona jernihnya dan luas koloninya.

2.2. Penentuan Indeks Selulolitik

Menghitung indeks selulolitik yaitu menghitung luas koloni total dan luas zona jernih total terlebih dahulu. Untuk menghitung luas koloni total yaitu dengan menghitung diameter koloni rata-rata. Begitu pula untuk menghitung luas zona jernih total yaitu dengan menghitung diameter zona jernih. Selanjutnya, diameter koloni digunakan untuk mencari luas koloni total, dan diameter zona jernih digunakan untuk mencari luas zona jernih total. Kemudian masing-masing luas yang didapat digunakan untuk menghitung indeks selulolitik yaitu luas zona jernih total dibagi dengan luas koloni total.

Untuk menentukan indeks selulolitik, rumus yang digunakan adalah berdasarkan persamaan yang digunakan oleh Rosenawati⁴⁾ seperti persamaan berikut ini:

- Luas koloni total (A): $\pi \cdot r^2$

$$\pi \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot d_{\text{koloni}}\right)^2$$

- Luas zona jernih total (B): $\pi \cdot R^2$

$$\pi \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot D_{\text{zona jernih}}\right)^2$$

Sehingga Indeks amilolitik: $\frac{B}{A}$

Keterangan: $\pi = 3,14$

r = jari-jari koloni

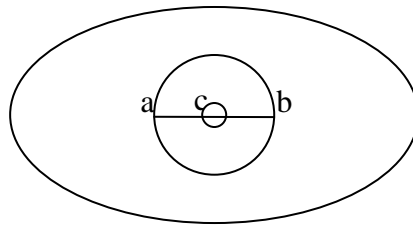
R = jari-jari zona jernih

d = deameter koloni

D = deameter zona jernih

A = Luas koloni total

B = Luas zona jernih total



Gambar 1. Koloni dan zona jernih pada media CMC agar

Ket: $a - b =$ deameter zona jernih

$c =$ deameter koloni

2.3. Produksi dan Penyiapan Enzim

Inokulum bakteri yang ditumbuhkan pada Nutrien Broth selama 24 jam diinokulasikan sebanyak 2 ml ke dalam 20 ml media (komposisi untuk 1000 ml, pepton 1 g, beef ekstrak 0,6 g, dan CMC 5 g). Inokulum bakteri kemudian diinkubasi selama 1 hari pada shaker inkubator dengan kecepatan 120 rpm dengan suhu 37°C. Setelah masa inkubasi, kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit. Cairan supernatan yang terbentuk merupakan ekstrak kasar enzim yang akan diuji aktivitasnya.

2.4. Pengujian Aktivitas Selulase

Pengujian aktivitas enzim berdasarkan modifikasi metode Hossain *et al.*⁵⁾. Cairan ekstrak kasar enzim sebanyak 1,8 ml dicampur dengan larutan CMC 0,5% dalam buffer sitrat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Selanjutnya masing-masing uji ditambahkan 2 ml larutan DNS untuk mengikat gula pereduksi dan membentuk warna indikator yang spesifik sehingga dapat terdeteksi pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 575 nm, lalu dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit kemudian diletakkan pada air dingin selama 20 menit agar enzim inaktif dan stabil pada saat dilakukan pengukuran absorbansinya. Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan unit per ml cairan enzim. Satu unit aktivitas setara dengan satu mikromol glukosa per menit sebagai hasil gula pereduksi.

2.5. Uji Bakteri *Bacillus* sp terhadap Kemampuan Menghasilkan Protease, Amilase dan Lipase

Untuk mengetahui kemampuan bakteri *Bacillus* sp dalam menghasilkan protease maka bakteri tersebut ditumbuhkan dalam medium skim milk agar (pepton 1 g, beef ekstrak 0,6 g, aquades 1000 ml, skim milk 10 g, dan agar 15 g) dan lalu diinkubasi selama semalam pada suhu 37°C. Adanya bakteri proteolitik ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri.

Pada uji kemampuan bakteri *Bacillus* sp dalam menghasilkan amilase maka bakteri tersebut ditumbuhkan dalam medium mengandung amilum (pepton 1 g, beef ekstrak 0,6 g, aquades 1000 ml, amilum 10 g, dan agar 15 g) dan lalu diinkubasi selama semalam pada suhu 37°C. Adanya bakteri amilolitik ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri setelah diberi pewarna larutan yodium (I_2KI).

Sedangkan untuk mengetahui kemampuan bakteri *Bacillus* sp dalam menghasilkan lipase maka bakteri tersebut ditumbuhkan dalam medium mengandung lemak (pepton 1 g, beef ekstrak 0,6 g, aquades 1000 ml, minyak zaitun 15 ml, agar 15 g, dan 0,001% *Rhodamine-B*) dan lalu diinkubasi selama tiga hari pada suhu 37°C. Aktifitas lipolitik diidentifikasi dengan terbentuknya warna orange yang berpendar pada permukaan koloni bakteri dan lebar diameter koloni.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Selulase

Isolasi bakteri penghasil selulase pada beberapa saluran pencernaan ayam kampung (tembolok, ampela, proventrikulus, usus halus dan usus besar) telah dilakukan. Bakteri- bakteri tersebut dibiakkan dalam media CMC, agar, dan *nutrien broth*. Setelah 24 jam, ditemukan ada 47 isolat bakteri yang mempunyai indeks selulolitik yang berbeda- beda (Tabel 1).

Tabel 1. Indeks selulolitik isolat bakteri dari saluran pencernaan ayam kampung.

No	Nama Organ	Kode	Indeks Selulolitik
1	Lambung kelenjar	APS-1	124
2		APS-2	298
3		APS-3	394
4		APS-4	38
5		APS-5	84
6		APS-6	28
7		APS-7	20
8		APS-8	38
No	Nama Organ	Kode	Indeks Selulolitik
9	Tembolok	ATS-1	11
10		ATS-2	29
11		ATS-3	26
12		ATS-4	201
13		ATS-5	8
14		ATS-6	1
15		ATS-7	23
16		ATS-8	12
17		ATS-9	7
18		ATS-10	187
19	Ampela	AAS-1	5
20		AAS-2	125
21		AAS-3	20
22		AAS-4	188
23		AAS-5	95
24		AAS-6	84
25		AAS-7	106
26		AAS-8	295
27		AAS-9	0,8
28		AAS-10	27
29	Usus Halus	AIS-1	480
30		AIS-2	46
31		AIS -3	7
32		AIS-4	1
33		AIS-5	130
34		AIS-6	4
35		AIS-7	23
36		AIS-8	4
37		AIS-9	2
38		AIS-10	5
39	Usus Besar	ACS-1	28
40		ACS-2	0,6
41		ACS-3	3
42		ACS-4	6
43		ACS-5	109
44		ACS-6	216
45		ACS-7	87
46		ACS-8	380
47		ACS-9	28

Keterangan: APS = Ayam kampung proventrikulus selulase
 ATS = Ayam kampung tembolok selulase
 AAS = Ayam kampung ampela selulase
 AIS = Ayam kampung intestine selulase
 ACS= Ayam kampung colon selulase

Berdasarkan Tabel 1 di atas, isolat bakteri yang menghasilkan indeks selulolitik tertinggi (480 mm) adalah isolat AIS-1 yang diisolasi dari usus halus, sedangkan indeks terendah (0,6 mm) dihasilkan oleh isolat ACS-2 yang diisolasi dari usus besar. Proses seleksi selanjutnya dilakukan dengan memilih 4 isolat bakteri yang memiliki indeks selulolitik tertinggi. Dari 47 isolat di atas terpilih 4 isolat (AIS-1, APS-3, ACS-8 dan APS-2) yang kemudian dimurnikan selama 20 hari. Proses pemurnian ini bertujuan untuk mengetahui isolat mana yang tetap menghasilkan indeks selulolitik tertinggi hingga hari ke-20. Setelah pemurnian yang ke-20 hari diketahui bahwa isolat yang tetap menghasilkan indeks selulolitik tertinggi yaitu isolat AIS-1.

3.2. Uji aktivitas Selulase, Lipase, Amylase dan Protease

Dari hasil uji aktivitas selulase diketahui bahwa ternyata bakteri tersebut tidak dapat menghasilkan aktivitas enzim pada media cair yang mengandung CMC walaupun ada zona jernih disekeliling CMC. Sedangkan pada uji terhadap amylase, protease, dan lipase menunjukkan adanya kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim tersebut.

Tabel 2. Kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim hidrolase (selulase, lipase, amilase dan protease).

Kode	Uji selulase (Indeks Selulolitik)	Aktivitas selulase (media cair)	Uji amylase	Uji protease	Uji lipase
AIS-1	480	-	+	+	+
APS-3	394	Tidak diuji	+	+	+
ACS-8	380	Tidak diuji	+	+	+
APS-2	298	Tidak diuji	+	+	+

3.3. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Selulase

Produksi enzim dipengaruhi beberapa faktor yaitu suhu, pH dan substrat. Dalam penelitian ini faktor suhu, pH dan substrat dalam media uji sama yaitu suhu 40°C, pH 7, dengan substrat media CMC agar. Berdasarkan hasil penelitian di atas ditemukan ada 47 isolat bakteri selulolitik. Aktivitas enzim selulase ke 47 isolat bakteri tersebut diperoleh dari beberapa saluran pencernaan ayam kampung berbeda-beda. Kemampuan selulolitik dapat berbeda disebabkan masing-masing spesies mikroba membutuhkan kultur optimum seperti pH, suhu dan nutrisi yang berbeda untuk memproduksi enzim dalam jumlah maksimal⁶⁾. Selain itu, faktor genetik juga mempengaruhi besarnya produksi enzim. Gen menentukan suatu pembentukan enzim yang berperan dalam rangkaian reaksi kimia pada saat berlangsungnya metabolisme sel yaitu anabolisme dan katabolisme. Gen setiap mikroorganisme berbeda-beda sehingga masing-masing mikroorganisme memiliki sifat yang berbeda. Dari tiap gen memiliki sifat yang spesifik untuk mengkode enzim-enzim tertentu. Beberapa jenis gen menurut fungsinya yaitu gen pengatur dan gen struktural. Gen struktural menentukan struktur enzim yaitu urutan asam aminonya sedangkan gen pengatur mengarahkan laju sintesis enzim⁷⁾.

Dari ke 47 isolat tersebut, bakteri yang diisolasi dari tembolok (isolat -AIS-1) memiliki indeks selulolitik tertinggi, hal ini disebabkan karena usus halus merupakan tempat terjadinya pencernaan makanan secara kimiawi dengan menggunakan bantuan enzim selain itu di usus halus juga terjadi proses penyerapan nutrisi berupa protein dan nutrisi lain diantaranya adalah selulosa⁸⁾. Dengan demikian, bakteri harus mensintesis enzim selulase dalam jumlah yang banyak agar proses pencernaan selulosa dapat lebih maksimal.

Dalam uji aktivitas selulase diketahui bahwa enzim tersebut tidak ada aktivitasnya ketika ditumbuhkan pada media cair CMC. Tidak munculnya aktivitas tersebut kemungkinan karena isolat AIS-1 tidak mampu menempel ke substrat CMC pada media cair tersebut, sehingga tidak mengeluarkan enzim untuk mendegradasi substrat tersebut. Kemungkinan lain, bahwa untuk mendegradasi substrat CMC tersebut

dalam kondisi cair perlu ada kerjasama dengan jenis bakteri lain^{9,13}). Kejadian mirip tersebut pernah terjadi pada bakteri *Geobacillus stearothermophilus* L-07 penghasil enzim mananase dan *Bacillus thermoleovorans* IT-08 penghasil enzim amilase. Bakteri *G. stearothermophilus* L-07 dapat menghasilkan enzim mananase pada media bungkil sawit ketika hidup bersama dengan *B. thermoleovorans* IT-08. Namun apabila *G. stearothermophilus* L-07 ditumbuhkan sendiri pada media bungkil sawit maka tidak dapat menghasilkan mananase^{9,14}).

Selain menghasilkan enzim selulase isolat AIS-1 juga menghasilkan enzim lipase, amilase dan protease. Hal ini dapat dilihat dari kemampuan isolat AIS-1 untuk hidup dalam media yang mengandung substrat minyak zaitun dan *Rhodamin-B*, pati serta skim milk. Namun kemampuan menghasilkan enzim-enzim tersebut belum diuji aktivitasnya (Tabel 2).

Selain itu, tingginya indeks selulolitik isolat AIS-1 kemungkinan disebabkan karena isolat tersebut memiliki kemampuan yang cepat dalam mensintesis dan mendegradasi selulosa. Jumlah enzim di dalam sel sangat bergantung pada kecepatan mensintesis dan mendegradasi asam amino, karena pada dasarnya dalam semua bentuk kehidupan, enzim disintesis dari asam amino dan didegradasi menjadi asam amino¹⁵). Setiap spesies bakteri memiliki batas toleransi tertentu pada parameter lingkungan tertentu. Fleksibilitas mikroba dalam menyesuaikan diri pada lingkungan yang berbeda nampak pada perubahan ekspresi genetik¹⁶). Bakteri selulolitik yang paling mampu bertoleransi dengan lingkungan akan menghasilkan enzim selulase dengan indeks tertinggi. Kemungkinan lain yang menyebabkan isolat AIS-1 memiliki indeks selulolitik tertinggi adalah karena substrat yang digunakan dalam media uji merupakan substrat yang sesuai bagi enzim yang dihasilkan oleh isolat AIS-1. Kemampuan bakteri probiotik memproduksi enzim selulase menjadikannya mampu menghidrolisis selulosa yang terdapat pada substratnya menjadi glukosa atau gula-gula lain yang larut dan dapat dijadikan sumber karbon bagi pertumbuhannya Susilowati *et al.*¹⁷).

4. KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan, telah berhasil diisolasi bakteri jenis *Bacillus* sp AIS-1 yang memiliki indeks selulolitik paling tinggi yaitu sebesar 480. Namun dari hasil uji aktivitas enzim, dalam bakteri ini ternyata tidak ditemukan aktivitas enzim selulase. ketika ditumbuhkan dalam media CMC broth.

DAFTAR PUSTAKA

1. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bact.*, 66, 365-378.
2. Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. and Mattila-Sandholm, T. 2008. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.*, 84 (3), 197-215.
3. Shah, N.P. 2000. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *J. Dairy Sci.*, 83 (4), 894-907.
4. Rosenawati, D., 1996. *Isolasi Khamir Penghidrolisis Pati Segar dari Bahan Ubi Kayu*. Skripsi. Unila. Bandar Lampung.
5. Hossain HZ, Abe J, Hizukuri S. 1996. Multiple forms of β -mannanase from *Bacillus* sp. KK01. *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 95-98.
6. Tillman, Allen D. 1998. Ilmu Makanan Ternak. UGM Press. Yogyakarta.
7. Pelczar, M.J., Chzn, E.C.S. and Krieg, N.R. 1993. *Microbiology Concept and Applications*. International edition. Micraw-Hill, Inc. United State of America, 947 pages.
8. Sudaryani, T, dan Hari,S. 1993. *Pembibitan Ayam Ras*. Penebar Swadaya. Jakarta. 79 hlm
9. Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K.M., Hughes, S.R., Christophor, L.P. and Sani, R.K.

2010. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strain. *Biores. Technol.*, 101 (22), 8798-8806.
10. Park, J.D., Kim, Y.A. and Yoon, K.H. 2009. Properties of a *Bacillus licheni formis* cellulase produced by recombinant *Escherichia coli*. *Korea J. Microbiol.*, 45 (3), 257-262.
 11. Mawadza, C., Hatti-Kaul, R. Zvauya, R. and Mattiason, B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strain. *J. Biotechnol.*, 83 (3), 177-187.
 12. Chidi, S.B., Godana, B., Ncube, I., Rensburg, E.J.V., Cronshaw, A. and Abotsi, E.K. 2008. Production, purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL4209. *Afr. J. Biotechnol.*, 7(21), 3939-3948.
 13. Kim, S.J., Lee, C.M., Han, B.R. and Jun, H.K. 2008. Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 282 (1), 44-51
 14. Sumardi. 2005. Isolasi, Karakterisasi, dan Produksi β -Mananase Ekstraseluler dari *Geobacillus stearothermophilus* L-07. Disertasi. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
 15. Nadeak M.R. 2005. Studi Isolat Aktinomisetes Penghasil protease dari Sponge Perairan Lelaga Teluk Lampung. Skripsi. Unila
 16. Atlas, R.M. and Barta, R. 1998. *Microbial ecology: Fundamental and Applications*. Menlo Park.: Benjamin/Summings Science Publishing.
 17. Susilowati D. N., Rosmimik, Saraswati R, Simanungkalit R.D.M., Gunarto L. 2008. Koleksi, karakterisasi, dan preservasi mikroba penyubur tanah dan perombak bahan organik. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. www.indobiogen.or.id/terbitan/pdf/warta_balitbio_23_desember_2003.pdf