



## EKSPLORASI BAKTERI PROTEOLITIK DARI *ILEUM GALLUS GALLUS* SEBAGAI KANDIDAT AGEN PROBIOTIK PAKAN TERNAK UNGGAS LOKAL

Tengku Gilang Pradana<sup>1\*</sup>, Andhika Putra<sup>2</sup>, Purwo Siswoyo<sup>3</sup>, Alfath Rusdhi<sup>4</sup>,  
Media Agus Kurniawan<sup>5</sup>, Adhona Bhajana Wijaya Negara<sup>6</sup>, Irfan Nurrakil Haz<sup>7</sup>  
Program Studi Peternakan, Universitas Pembangunan Panca Budi  
\*Email: gilangpradana@dosen.pancabudi.ac.id

### ABSTRACT

*This study aims to explore and investigate proteolytic bacteria from ileum of Gallus gallus as probiotic agent candidates in local poultry feed. This research was conducted in the Village of Klambir V and Laboratory at Pembangunan Panca Budi University, Medan. The exploratory research method included bacterial isolation, activity of proteolytic bacterial and proteolytic bacterial staining. The results showed that there were twenty proteolytic isolates with different morphological characteristics of the bacteria. Ten isolates belong to the group of gram-positive bacteria and ten isolates belong to the group of gram-negative bacteria. There are three isolates with the highest enzyme production, there are GP sp. 1, GP sp. 3 and GP sp. 4 with Proteolytic Index (IP) value of 1,500, 1,533, and 1,531 and the three isolates with the lowest enzyme production in GP sp. 9, GP sp. 11 and GP sp. 13 with Proteolytic Index (IP) values of 0.696, 0.641, and 0.562. Based on the research results, GP sp. 1, GP sp. 3 and GP sp. 4 has high enzyme production and include to the group of gram-positive bacteria so that, three isolates have the potential to be candidates for probiotic agents for local poultry feed.*

**Keywords:** *Proteolytic bacteria, Ileum, Proteolytic Index, Probiotic.*

### PENDAHULUAN

Ayam kampung (*Gallus gallus*) merupakan salah satu jenis unggas yang umum dibudidayakan karena memiliki tingkat pertumbuhan sangat cepat, kemampuan adaptasi baik dengan kondisi lingkungan dan mempunyai tingkat efisiensi yang tinggi. Keberhasilan bisnis peternakan ayam kampung tergantung pada beberapa faktor penting, salah satunya adalah manajemen ketersediaan pakan. Ketersediaan nutrisi pakan menjadi sangat penting untuk menjaga ternak ayam tetap sehat dan selalu produktif. Ketersediaan pakan merupakan komponen terbesar dari biaya produksi yang dapat mencapai 60 – 70 % dari total biaya produksi. Hal ini disebabkan beberapa bahan baku utamanya masih diimpor seperti jagung, bungkil kedelai, tepung ikan, tepung daging dan tepung tulang, dan lain-lain. Formulasi pakan dan teknik pencampuran pakan yang efisien dan efektif akan menghasilkan pakan dengan mutu baik dan harga murah. Pemanfaatan probiotik yang merupakan campuran berbagai spesies mikroorganisme, terutama mikroorganisme pendegradasi komponen protein (*proteolytic microorganisms*) melalui pakan dapat meningkatkan produktivitas temak. Hal ini berkaitan dengan meningkatnya kecepatan cerna (*rate of digestion*) protein pada awal proses pencernaan sehingga mempengaruhi ketersediaan energi Adenine Triphosphate (ATP) yang diperlukan dalam proliferasi mikrobial rumen.

Dalam upaya meningkatkan efisiensi pemanfaatan pakan untuk menghasilkan produk temak secara optimal perlu adanya bahan-bahan pakan yang mempunyai nilai manfaat tinggi. Zat gizi yang terkandung didalam bahan pakan kadang-kadang berada pada ikatan molekuler yang sulit dicerna sehingga tidak dapat dimanfaatkan sebagai sumber zat gizi yang diperlukan temak.

Desa Klambir V Kebun merupakan salah satu desa penghasil daging ayam tertinggi di Sumatera Utara. Dengan produksi sebanyak ini, kebutuhan akan pakan juga akan



dibutuhkan dalam jumlah yang besar. Salah satu pemanfaatan non-karkas adalah *ileum* yang berpotensi untuk dijadikan sebagai kandidat agen probiotik pakan fermentasi unggas. *Ileum* merupakan bagian dari usus halus yang berperan dalam penyerapan sari – sari makanan dan tempat tumbuh dan berkembangnya bakteri yang dapat mendegradasi pakan, salah satunya bakteri proteolitik.

Bakteri proteolitik adalah sekelompok bakteri yang mempunyai kemampuan untuk memecah protein, dengan memutus ikatan peptida pada protein tersebut. Bakteri proteolitik mampu menghasilkan enzim protease. Enzim protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi asam amino. Masing – masing protease mempunyai pengikat peptida yang spesifik. Sifat proteolitik didasarkan pada kemampuan untuk memutus ikatan peptida protein. Hampir semua protease merupakan protein sederhana yang disusun hanya oleh asam amino, tanpa adanya gugus prostetik atau senyawa non protein. Sebagian besar tidak memerlukan ion aktivator. Protease termasuk golongan enzim yang relatif kuat karena tahan kondisi lingkungan, pH dan suhu yang ekstrim (Suhartono, 1991). Berdasarkan latar belakang diatas, perlu dilakukan penelitian mengenai eksplorasi bakteri proteolitik dari *ileum Gallus gallus* sebagai kandidat agen probiotik dalam pembuatan pakan fermentasi unggas.

## TINJAUAN PUSTAKA

### Bakteri

Bakteri adalah golongan mikroorganisme prokariotik uniseluler, yang termasuk kedalam kelas *Schizomycetes*, berkembangbiak dengan melakukan pembelahan sel secara aseksual. Kata bakteri diperoleh dari bahasa Yunani “bakterion” yang diartikan sebagai tongkat atau batang. Bakteri dapat diperoleh dari mana saja, misalnya dari tanah dengan sampah yang banyak, sisa-sisa makanan yang telah basi, rongga mulut ataupun dari sela gigi (Dwidjoseputro, 2011). Bakteri banyak tersebar luas di alam, baik di tanah, lumpur, laut, atmosfer di tubuh hewan, manusia maupun tanaman. Jumlah bakteri tergantung pada keadaan sekitarnya, contohnya bakteri yang ada di dalam tanah jumlahnya bergantung pada jenis dan tingkatan kesuburan tanah (Djide dan Sartini, 2005).

Bentuk dari bakteri dipengaruhi oleh kondisi medium dan usia bakteri. Bentuk serta ukuran bakteri bisa dibandingkan dengan syarat kondisi bakteri harus sama, dari mulai temperatur dimana bakteri itu disimpan, sumber cahaya penyinarannya sampai pada kesamaan usia bakteri pun harus diperhatikan. Kelainan-kelainan pada bentuk bakteri akan kembali normal apabila ditumbuhkan kembali di dalam media yang baru. Didasari pada morfologinya, terdapat tiga golongan dari bakteri yakni golongan kokus, basil dan spiral. Golongan kokus berisi golongan bakteri dengan bentuk serupa dengan bola berukuran kecil. Bakteri dengan bentuk satu kokus disebut monokokus, kokus dengan rantai gandengan panjang biasa disebut streptokokus, kokus dengan gandeng dua disebut sebagai diplokokus, kokus dengan bentuk berkelompok berempat disebut tetrakokus, dan yang berkelompok menjadi satu untaian disebut stapilokokus, sedangkan kokus yang berkelompok mirip kubus disebut sarkina. Kemudian golongan kedua yaitu basil, golongan bakteri yang bentuknya mirip dengan tongkat pendek, silindris yang dapat bergandengan. Basil yang gandengannya panjang dikenal sebagai streptobasil, basil dengan gandengan dua disebut sebagai diplobasil dan basil tunggal disebut sebagai monobasil. Spirilia merupakan bakteri dengan bentuk bengkok bergelombang atau serupa spiral. Golongan ini lebih kecil, jika dibandingkan golongan kokus maupun golongan basil (Dwidjoseputro, 2011).



## Isolasi Bakteri

Isolasi adalah suatu kegiatan mengambil mikroba dari alam kemudian menumbuhkannya pada suatu media tumbuh buatan. Adapun prinsip isolasi mikroba/mikroorganisme yakni memisahkan satu jenis mikroorganisme yang diinginkan dengan mikroorganisme lainnya yang sumbernya merupakan campuran dari berbagai jenis mikroorganisme. Isolasi dapat dilakukan dengan cara menumbuhkan mikroba pada media padat selektif tergantung jenis mikrobanya, nantinya sel-sel mikroba akan tumbuh membentuk koloni dengan sel yang tetap pada media (Sutedjo, 1996). Kegiatan isolasi bertujuan untuk memperoleh biakan murni dengan cara memisahkan mikroba yang ingin diuji dari mikroba lainnya dengan menumbuhkannya pada media selektif. Media selektif merupakan media khusus yang digunakan dalam menumbuhkan mikroorganisme tertentu, didalamnya terkandung zat-zat khusus yang dimanfaatkan oleh mikroba tertentu yang tumbuh sesuai dengan media selektifnya. Pengidentifikasian mikroba bertujuan untuk mengetahui jenis mikroorganisme tertentu melalui tahap pengamatan, pengujian, pencatatan, dan analisis berdasarkan hasil pengujian (Susatyo., 2006).

Teknik dalam pengisolasian bakteri terdiri dari empat metode isolasi yang dapat digunakan yaitu isolasi tunggal, gores, tebar, dan tuang. Isolasi tunggal dilakukan dengan meneteskan suatu bahan yang didalamnya terkandung mikroba pada kaca penutup memakai alat bantu mikropipet, dan kemudian diamati menggunakan mikroskop. Isolasi gores dilakukan dengan menggoreskan ujung jarum ose yang telah mengandung mikroba secara perlahan dan hati-hati pada permukaan media agar secara zig-zag. Isolasi tebar dilakukan dengan menebarkan bahan yang didalamnya terkandung mikroba pada permukaan media agar. Isolasi tuang dilakukan melalui pengambilan sedikit suspensi sampel yang didalamnya telah terdapat bakteri yang telah diencerkan dan suspensi sampel tersebut kemudian disebarkan didalam suatu medium. Identifikasi Bakteri dapat dilakukan dengan pengamatan makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan makroskopik dapat dilakukan untuk mengamati karakteristik morfologi koloni bakteri yang didasari pada bentuk koloni ((diamati dari atas) berbentuk bulat (*circular*), berbenang (*filamentous*), tidak beraturan (*irregular*), seperti akar (*rhizoid*), atau seperti kumparan (*spindle*)), elevasi koloni (diamati dari samping) datar (*flat*), membukit (*umbonate*), timbulmendatar (*raised*), atau timbulmelengkung (*convex*)), tepi koloni ((diamati dari atas) berupa utuh (*entire*), berbenang (*filamentous*), berombak (*lobate*), bergerigi (*serrate*), keriting (*undulate*)), dan warna atau pigmentasi koloni ((diamati dari atas) putih/cenderung putih, keabu-abuan, kekuningan ataupun hampir transparan) (Dwidjoseputro, 2011).

Bioaktivator adalah bahan bioaktif yang dapat merombak bahan organik. Secara spesifik, bioaktivator terdiri dari isolat mikroorganisme yang telah dimurnikan sehingga kemampuannya khusus dalam merombak suatu bahan organik (Semaun, 2021). Pemanfaatan bioaktivator dalam pakan ternak dapat berefek positif dalam peningkatan daya cerna pakan, penyerapan nutrisi dan juga dapat menghilangkan bau kotoran ternak (Sutoro, 2010). Bioaktivator terdiri dari bahan yang mengandung mikroorganisme. Mikroorganisme dalam bioaktivator dapat berupa berbagai jenis bakteri, salah satunya adalah bakteri proteolitik. Mikroorganisme tersebut dapat bekerja secara efektif dalam memfermentasi dan menguraikan bahan organik (Susilo, 2012). Sutoro (2010), menyatakan bahwa yang terkandung didalam bioaktivator adalah strain terpilih dengan daya adaptasi tinggi yang dikemas bersama zat pembawa alami sehingga daya hidup mikroorganisme dapat dipertahankan hingga satu tahun, tanpa mencemari lingkungan, mempercepat proses pengomposan, lebih mudah dan murah karena tidak ada tambahan bahan lain.



## Bakteri Proteolitik

Bakteri proteolitik adalah sekelompok bakteri yang mempunyai kemampuan untuk memecah protein, dengan memutus ikatan peptida pada protein tersebut. Bakteri proteolitik mampu menghasilkan enzim protease. Enzim protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi asam amino. Masing – masing protease mempunyai pengikat peptida yang spesifik. Enzim ini diperoleh dari tumbuhan dan mikroorganisme. Sifat proteolitik didasarkan pada kemampuan untuk memutus ikatan peptida protein. Hampir semua protease merupakan protein sederhana yang disusun hanya oleh asam amino, tanpa adanya gugus prostetik atau senyawa non protein. Sebagian besar tidak memerlukan ion aktivator. Protease termasuk golongan enzim yang relatif kuat karena tahan kondisi lingkungan, pH dan suhu yang ekstrim. Dengan demikian, enzim ini agak mudah ditangani (Suhartono, 1991). Beberapa bakteri penghasil protease komersial antara lain genus *Bacillus* (*B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, dan *B. polymixa*). Kelompok bakteri lain adalah *Aeromonas*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, dan *Staphylococcus* (Rao et al, 1998).

Golongan bakteri asam laktat dari jenis *Lactobacillus sp.* dan *Saccaromyces* dari golongan yeast sering dijual dipasaran dalam bentuk probiotik. *Pseudomonas* termasuk dalam famili pseudomonadaceae dengan ciri-ciri sel serupa batang lurus, kadang-kadang serupa bola. Bergerak dengan flagel yang terdapat pada ujung. Jumlah flagel satu atau lebih. Beberapa spesies tidak bergerak. Gram positif, habitat tanah atau air tawar dan air laut. Banyak spesies hidup sebagai parasit pada tanaman, tidak begitu banyak pada hewan. Ukuran 0,51,0 x 3,0 - 4,0 um. *Pseudomonas* menghasilkan protease jenis karboksipeptidase logam dan protease serin (Suhartono, 1991).

## METODE PENELITIAN

### Isolasi Bakteri Proteolitik

Sebanyak 1gr ileum *Gallus gallus* dihomogenkan pada larutan garam fisiologis untuk mendapatkan sampel  $10^{-1}$ . Kemudian diambil 1 ml sampel untuk dicampurkan kedalam 9 ml aquades pada tabung yang lain, untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-2}$  dan dilakukan sampai mendapatkan pengenceran  $10^{-6}$ . Sebanyak 1 ml sampel diambil dari pengenceran  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  dan  $10^{-6}$  menggunakan mikropipet dan dituang kedalam petridish yang telah berisi media *Nutrient Agar* + 1% *Skim Milk*. Sampel kemudian disebar menggunakan *cell spreader* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Uji positif ditandai dengan adanya zona bening yang terbentuk di sekeliling koloni akibat adanya hidrolisis kasein menjadi nitrogen terlarut. Koloni tunggal yang menghasilkan zona bening kemudian dimurnikan. Isolat yang memiliki indeks proteolitik tertinggi selanjutnya dilakukan pengamatan karakteristik morfologi, pewarnaan gram dan untuk uji tahap selanjutnya.

### Uji Aktivitas Proteolitik

Kemampuan bakteri dalam menghidrolisis protein ditandai dengan pembentukan zona bening disekitar koloni bakteri. Setiap isolat yang dimurnikan digoreskan pada medium *Nutrient Agar* + 1% *Skim Milk*. Isolat diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam dan diamati terbentuknya zona bening pada masing - masing koloni. Zona bening menunjukkan bakteri dapat menghasilkan enzim protease. Indeks Proteolitik (IP) pada masing-masing koloni dihitung untuk mengetahui daya degradasi bakteri terhadap protein didalam media dengan persamaan berikut:



$$\text{Indeks Proteolitik (IP)} = \frac{\text{diameter zona bening (mm)} - \text{diameter koloni (mm)}}{\text{diameter koloni (mm)}}$$

### 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.

## HASIL PENELITIAN DAN DISKUSI

### Hasil Penelitian

#### Karakteristik Morfologi Bakteri Proteolitik

Hasil pengamatan diperoleh dua puluh koloni bakteri proteolitik dengan karakteristik morfologi yang berbeda. Karakteristik morfologi koloni bakteri proteolitik dapat dilihat pada Tabel berikut.

Tabel 1. Karakteristik Morfologi Bakteri Proteolitik dari *Ileum Gallus gallus*

No.	Kode Isolat	Morfologi			
		Bentuk	Tepi	Warna	Elevasi
1.	GP sp. 1	Circular	Entire	White	Raised
2.	GP sp. 2	Irregular	Irregular	Cream	Umbonate
3.	GP sp. 3	Circular	Entire	White	Flat
4.	GP sp. 4	Irregular	Lobate	White	Flat
5.	GP sp. 5	Circular	Entire	Translucent	Convex
6.	GP sp. 6	Irregular	Lobate	White	Raised
7.	GP sp. 7	Circular	Irregular	White	Convex
8.	GP sp. 8	Irregular	Lobate	Cream	Raised
9.	GP sp. 9	Circular	Entire	White	Raised
10.	GP sp. 10	Rhizoid	Rhizoid	White	Raised
11.	GP sp. 11	Irregular	Entire	White	Convex
12.	GP sp. 12	Filamentous	Filamentous	White	Raised
13.	GP sp. 13	Irregular	Lobate	White	Raised
14.	GP sp. 14	Circular	Irregular	White	Convex
15.	GP sp. 15	Circular	Entire	White	Raised
16.	GP sp. 16	Circular	Lobate	White	Raised
17.	GP sp. 17	Circular	Entire	White	Flat
18.	GP sp. 18	Rhizoid	Rhizoid	Cream	Raised
19.	GP sp. 19	Irregular	Lobate	Cream	Raised
20.	GP sp. 20	Irregular	Lobate	Cream	Raised

Bakteri proteolitik dapat tumbuh dengan baik pada medium yang kaya akan protein. Zona bening terbentuk karena adanya aktivitas enzim protease dalam mendegradasi protein. Karakteristik morfologi bakteri proteolitik ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Isolat Bakteri Proteolitik dari *Ileum Gallus gallus*

### Aktivitas Bakteri Proteolitik dari *Ileum Gallus gallus*

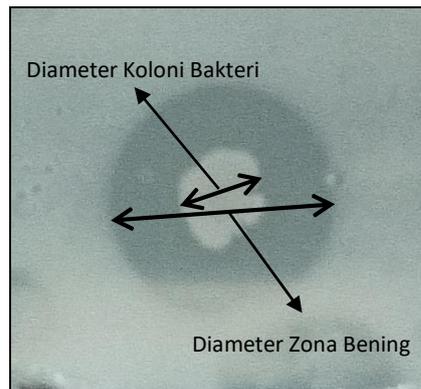
Indeks proteolitik diperoleh dari jumlah selisih diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri kemudian dibagi dengan diameter koloni bakteri. Hasil pengukuran dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 2. 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	Rerata
GP sp. 1	6	6	13	17	1.167	1.833	1.500
GP sp. 2	7.5	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
GP sp. 11	8	11.5	13.5	24	0.688	1.087	0.887
GP sp. 12	5	5.5	8	14	0.600	1.545	1.073
GP sp. 13	7	8.5	15.5	19	1.214	1.235	1.225
GP sp. 14	9.5	10	17	20	0.789	1.000	0.895
GP sp. 15	8	14.5	17	28	1.125	0.931	1.028
GP sp. 16	10	11.5	18	18.5	0.800	0.609	0.704
GP sp. 17	13	13	25.5	32	0.962	1.462	1.212
GP sp. 18	10	17.5	25	31.5	1.500	0.800	1.150
GP sp. 19	8	11	15.5	21	0.938	0.909	0.923
GP sp. 20	7	9.5	13	19.5	0.857	1.053	0.955

Berdasarkan Gambar 2, Indeks Proteolitik (IP) dihitung berdasarkan selisih diameter zona bakteri (warna putih padat) dan diameter zona bening (putih bening). Zona bening yang terbentuk menandakan kemampuan bakteri proteolitik dalam menghasilkan enzim protease. Luas diameter zona bening yang terbentuk berbanding lurus dengan tingginya produksi

enzim protease yang dihasilkan.



Gambar 2. Pengamatan Indeks Proteolitik

### Pewarnaan Gram Bakteri Proteolitik dari *Ileum Gallus gallus*

Bakteri yang telah dimurnikan kemudian dilakukan pewarnaan gram secara bertingkat menggunakan pewarna basa dan asam. Hasil pewarnaan gram bakteri dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 3. Hasil Pewarnaan Gram Bakteri Proteolitik

Isolat Gram Positif	Isolat Gram Negatif
<i>GP sp. 1</i>	<i>GP sp. 2</i>
<i>GP sp. 3</i>	<i>GP sp. 5</i>
<i>GP sp. 4</i>	<i>GP sp. 6</i>
<i>GP sp. 9</i>	<i>GP sp. 7</i>
<i>GP sp. 10</i>	<i>GP sp. 8</i>
<i>GP sp. 12</i>	<i>GP sp. 11</i>
<i>GP sp. 13</i>	<i>GP sp. 16</i>
<i>GP sp. 14</i>	<i>GP sp. 18</i>
<i>GP sp. 15</i>	<i>GP sp. 19</i>
<i>GP sp. 17</i>	<i>GP sp. 20</i>

## DISKUSI

### Karakteristik Morfologi Bakteri Proteolitik dari *Ileum Gallus gallus*

Berdasarkan Tabel 1 terdapat empat tipe bentuk morfologi, yaitu *circular*, *irregular*, *rhizoid* dan *filamentous*. Bentuk *circular* merupakan yang paling umum dijumpai pada sembilan jenis bakteri proteolitik. Karakteristik tepi memiliki lima tipe, yaitu *entire*, *irregular*, *lobate*, *rhizoid* dan *filamentous* sedangkan karakteristik warna dan elevasi terdiri dari masing – masing tiga tipe. Berdasarkan Tabel 1, dapat dilihat bahwa bentuk bakteri proteolitik yang berasal dari *ileum Gallus gallus* didominasi oleh bentuk *circular*. Warna sendiri, putih terlihat paling banyak diikuti warna *cream* dan transparan. Namun, pada tepi koloni terlihat cukup beragam berupa *irreguler*, *lobate*, *rizhoid*, *filamentous*, dan *entire*. Hal yang sama juga terlihat pada elevasi yang cukup beragam berupa *raised*, *convex*, *umbonate* dan *flat*. Hasil penelitian ini mirip dengan penelitian Rizaldi *et al.*, (2018) yang berhasil mengisolasi dua belas isolat bakteri proteolitik yang berasosiasi dengan lamun dengan bentuk bulat, tak beraturan, *filament* dan akar. bertepi utuh, bergerigi, berombak dan berbelah, warna putih, krem dan orange, serta elevasi datar, cembung dan membukit. Gill *et*



*al.*, (2016) juga berhasil mengisolasi 2 bakteri penghasil protease dari limbah dapur dengan bentuk *irregular*, berelevasi *flat* dengan margin *endulated* dan *lobate*.

*Ileum Gallus gallus* memiliki keanekaragaman jenis bakteri proteolitik yang cukup beragam dengan karakteristik yang berbeda – beda. Hal ini dimungkinkan karena *ileum* merupakan tempat penyerapan makanan terakhir yang dibantu oleh dengan aktivitas berbagai jenis mikroorganisme. Salah satu bakteri yang dapat beradaptasi dengan baik di saluran pencernaan adalah bakteri proteolitik. Secara alamiah pada lingkungan yang sama mikroorganisme akan saling bersaing maupun berkonsorsia dengan mikroorganisme lainnya (Suyasa, 2011).

Berdasarkan hasil penelitian terdapat isolat yang memiliki kemiripan morfologi dengan bakteri yang telah teridentifikasi pada penelitian terdahulu. *Isolat GP sp. 4* dengan bentuk *irreguler*, tepi *lobate*, berwarna putih, elevasi *flat*, dan gram positif diasumsikan merupakan bakteri *Bacillus sp.* Dalam penelitian Rizaldi *et al.*, (2018) bakteri *Bacillus sp.* memiliki bentuk tak beraturan, tepi utuh, elevasi datar, warna putih, bentuk *bacill*, dan gram positif. Selain itu, *GP sp. 3* dapat diidentifikasi sebagai jenis dari bakteri *Pseudomonas sp.* karena memiliki bentuk *filamentous*, bertepi *filamentous*, berwarna putih dengan elevasi *raised* dan gram negatif. Menurut Hastuti (2017), bakteri *Pseudomonas stutzeri* berwarna putih kekuningan, bentuk berbenang– benang dengan tepi licin, elevasi timbul dan gram negatif. Sementara itu isolat *GP sp. 7* berpotensi merupakan jenis dari *Proteus sp.* disebabkan bentuknya *circular*, dengan tepi *irregular*, berwarna putih bening, elevasi *convex* dan gram negatif. Dalam penelitian Sony dan Potty (2016), *Proteus mirabilis* termasuk gram negatif berbentuk *circular* dengan tepi *entire*, elevasi *undulate* dan tekstur *smooth, oily*.

#### **Aktivitas Bakteri Proteolitik dari *Ileum Gallus gallus***

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat bahwa tiga isolat dengan rata-rata Indeks hidrolisis proteolitik terbesar yaitu *GP sp. 1*, *GP sp.3* dan *GP sp. 4* dengan nilai masing- masing 1.533, 1.531, dan 1.500. Hasil penelitian ini lebih kecil jika dibandingkan dengan hasil penelitian Fitriana dan Asri (2022) yang berhasil mengisolasi 7 jenis isolat dari bakteri *rhizosphere* pada tanaman kedelai, 3 diantaranya memperoleh indeks proteolitik sebesar 2,54, 1,77, 1,80. Menurut Muchtadi dan Betty dalam (Triyanto *et al.*, 2009) Zona bening yang terdapat di sekitar koloni merupakan hasil dari proses pemecahan protein kasein (susu skim), yang merupakan suspensi koloid berwarna putih, menjadi senyawa turunan yang bersifat transparan dan lebih mudah larut. Diameter zona bening pada lama inkubasi 48 jam lebih tinggi jika dibandingkan pada lama inkubasi 24 jam, hal ini didukung Susanti (2003), bahwa diameter zona bening akan bertambah seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi.

Rata-rata indeks hidrolisis proteolitik dua puluh isolat yang diperoleh dapat dikategorikan sebagai indeks hidrolisis proteolitik rendah. Hal ini merujuk pada (Ahmad *et al.*, 2013) yang mengkategorikan indeks hidrolisis 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. Isolat bakteri proteolitik berpotensi dikembangkan apabila memiliki nilai indeks lebih dari atau sama dengan 3 (Akhdia, 2003). 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). Yusmarini *et al.*, (2009) menambahkan dengan semakin besarnya zona bening maka semakin besar pula potensi isolat tersebut dalam menghasilkan enzim protease.



### Pewarnaan Gram Bakteri Proteolitik dari *Ileum Gallus gallus*

Berdasarkan Tabel 3, dapat dilihat bahwa sebanyak dua puluh isolat bakteri proteolitik yang berhasil diisolasi dari *ileum Gallus gallus* dengan sepuluh diantaranya teridentifikasi sebagai kelompok bakteri positif dan sepuluh lainnya sisanya merupakan kelompok bakteri negatif. Perbedaan warna gram bakteri ini dikarenakan perbedaan kandungan dinding selnya. Bakteri dengan gram negatif umumnya memiliki dinding sel dengan kandungan lipida yang tinggi. Lipida dapat larut dengan menggunakan aseton alkohol sehingga zat pewarna kompleks *Cristal Violet* yang terdapat pada dinding sel akan luruh yang kemudian zat pewarna safranin diikat, sehingga pada saat pengamatan dengan mikroskop, warna bakteri akan tampak merah (Campbell et al., 2003) sedangkan pada bakteri dengan gram positif dinding selnya terdiri dari peptidoglikan yang tidak mudah larut oleh aseton alkohol sehingga warna biru keunguan zat pewarna *Cristal Violet* tetap dipertahankan pada waktu pengamatan menggunakan mikroskop (Lay, 1994).

Sepuluh isolat bakteri yang teridentifikasi sebagai gram negatif dimungkinkan tidak dapat digunakan sebagai bioaktivator dalam memfermentasi pakan ternak. Hal ini karena pada dinding sel bakteri gram negatif terdapat endotoksin (Hameed et al., 2003). Endotoksin merupakan komponen lipopolisakarida (LPS) yang dapat menyebabkan penyakit dan hanya akan keluar saat bakteri mengalami lisis (mati/hancur) (Rini dan Jamilatur, 2020). Beberapa penyakit yang disebabkan endotoksin antara lain *ruminal acidosis*, *fatty liver*, *ketosis*, *milk fever*, *laminitis*, *retained placenta (RP)*, *displaced abomasum (DA)*, *downer cow syndrome (DCS)*, penyakit infeksi seperti *mastitis* dan *metritis* (Eckel dan Burmin, 2020), *septic shock* atau bahkan kematian mendadak (Mani, 2012). Endotoksin akan sulit untuk dihilangkan apabila sebelum dilakukan sterilisasi telah ada bakteri gram negatif pada bahan yang ingin disterilisasi (Hadad dan Zuhrotun, 2021).

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, isolat *GP sp. 1*, *GP sp.3* dan *GP sp. 4* memiliki produksi enzim yang cukup tinggi dengan nilai Indeks Proteolitik (IP) sebesar 1.500, 1.533, dan 1.531. Selain itu, ketiga isolat ini juga termasuk kedalam golongan bakteri gram positif sehingga berpotensi dijadikan sebagai kandidat agen probiotik pakan fermentasi unggas lokal.

### 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 Sciences Journal*, 1(1): 1420-1426.
- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Buletin Plasma Nutfah*, 9 (2): 38-44.
- Djide, M. N dan Sartini, 2005, Mikrobiologi Farmasi Dasar, Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Dwidjoseputro, D. 2011. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Surabaya: Djambatan.
- Eckel, E, F dan Ametaj, B, N. 2020. Bacterial Endotoxins and Their Role in Periparturient Diseases of Dairy Cows: Mucosal Vaccine Perspectives. *Dairy I*(1): 61–90.
- Fitriana, N dan Asri, M. 2022. Aktivitas Proteolitik pada Enzim Protease dari Bakteri *Rhizosphere* Tanaman Kedelai (*Glycine max L.*) di Trenggalek. *LenteraBio*, 11(1):



- 144-152.
- Gill, Sher Singh., Shrivastav, Archana., dan Jana, Asha Mukul. 2016. Isolation and Identification of Protease producing Bacteria through Biodegradation of Protein content of Kitchen Wastes in Gwalior, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5 (10): 204-211.
- Hameed, A.A. Abdel, A.A. Shakour dan H.I. Yasser. 2003. Evaluation of bio- aerosols at an animal feed manufacturing industry: A case study. *Aerobiologia*, 1(19): 89-95.
- Hastuti, U. S., Sarwendah., Febriani., Nugraheni., Asri., Asna dan Putri, M. 2017. Identifikasi dan Penentuan Indeks Hidrolisis Protein pada Bakteri Proteolitik dari Tanah Mangrove di Margomulyo, Balikpapan. *Proceeding Biology Education Conference*, 14 (1): 265 – 270.
- Mani V., Weber, T. E., Baumgard, L. H., dan Gabler, N. K. 2012. Growth and Development Symposium: Endotoxin, inflammation, and intestinal function in livestock. *J ANIM SCI*, 90(1):1452-1465.
- Nurmalinda A., Periadnadi, dan Nurmiati. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Bakteri Indigenous Pemfermentasi dari Buah Durian (*Durio zibethinus Murr.*). *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 2(1): 8-13.
- Rao, M.B., Tangsale, A.M., Ghasge, M.S., Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnology Aspects of Microbial Protease. *Microb Mol Biol Rev* 62(1): 597-635.
- Rizaldi. Rachmat, Woro Hastuti Setyantini, dan Sudarno. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik yang Berasosiasi dengan Lamun (*Enhalus acoroides*) di Pantai Bama, Taman Nasional Baluran, Situbondo, Jawa Timur. *JIPK*, 10 (1): 1-10.
- Semaun, R. 2021. *Kajian Bahan Bioaktivator Limbah Buah Mengkudu Dalam Pupuk Organik Cair Terhadap Produksi Rumput Gajah Mini (Pennisetum Purpureum Cv. Mott) Sebagai Pakan Kambing*. Disertasi. Program Doktor Ilmu Pertanian Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar.
- Sony, I. S. dan V. P. Potty. 2016. Isolation and Identification of Protease Producing Bacteria from Food Processing Industries. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(3):181-189.
- Suhartono. 1991. *Protease*. Bogor: IPB Press.
- Susanti, E. V. H. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15. *Jurnal Biodiversitas*, 4(1): 12-17.
- Susatyo, I., D. 2006. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Gelatinolitik Asal Tambak Daerah Gresik dan lamongan*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Susilo, H. 2012. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Sutedjo, M. 1996. *Mikrobiologi Tanah*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Sutoro, Y., Soelaeman dan Iskandar. 2010. *Budidaya Tanaman Jagung*. Bogor: Balitbang Tanaman Pangan.
- Suyasa, I. W. B. 2011. Isolasi bakteri pendegradasi minyak/lemak dari beberapa sedimen perairan tercemar dan bak penampungan limbah.
- Yusmarini, Retno Indrati, Tyas Utami, dan Yustinus Marsono. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Proteolitik dari Susu Kedelai yang Terfermentasi Spontan. *Jurnal Natur Indonesia*, 12(1): 28-33.