

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL ENZIM FITASE SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK UNTUK TERNAK UNGGAS

Zaid Al Gifari, Khairil Anwar, Anwar Rosyidi, Muhamad Ali, Muhamad Amin
Universitas Mataram, Indonesia

Email: zaidalgifari@gmail.com, chaerilanwar76@gmail.com,

anwarrosyidi@gmail.com, m_ali@unram.ac.id, muhamadamin@gmail.com

Abstrak

Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang bersifat non-patogenik dan non-toksik yang menguntungkan bagi inang. Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri probiotik yang digunakan secara luas pada ternak unggas dan memiliki keunggulan dalam menghasilkan enzim ekstraseluler. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi, identifikasi dan karakterisasi bakteri asam laktat penghasil enzim fitase yang bersumber dari saluran pencernaan entok (*Cairina moschata*). Berdasarkan produksi enzim fitase, 5 isolat bakteri yaitu AL01, RIL07, FA16, AN32, dan NS05 teridentifikasi menghasilkan enzim fitase yang ditandai dengan dengan terbentuknya *clearing zone*.

Kata kunci: Phytase, bacteria, probiotics.

Abstract

*Probiotics are living microorganisms that are non-pathogenic and non-toxic that are beneficial to the host. Lactic acid bacteria (LAB) is a probiotic bacteria that is widely used in poultry and has the advantage of producing extracellular enzymes. This study aims to isolate, identify and characterize lactic acid bacteria that produce phytase enzymes sourced from the digestive tract of wild goose (*Cairina moschata*). Based on the production of phytase enzymes, 5 bacterial isolates namely AL01, RIL07, FA16, AN32, and NS05 were identified to produce phytase enzymes which were characterized by the formation of a clearing zone.*

Keywords: Phytase, bacteria, probiotics

Pendahuluan

Peternakan unggas ialah kegiatan yang bertujuan untuk menghasilkan produk ternak berupa telur dan daging. Tantangan global dalam budidaya perunggasan di Indonesia ialah lemahnya kinerja penyediaan bahan baku pakan, yang merupakan 60-70 persen dari biaya produksi karena sebagian besar masih sangat tergantung dari impor. Sehingga pengembangan industri peternakan unggas diarahkan untuk optimalisasi penggunaan bahan lokal sebagai pakan ternak unggas. Penggunaan bahan lokal sebagai pakan ternak unggas merupakan upaya untuk mengurangi impor bahan baku dan menurunkan biaya produksi dalam industri perunggasan yang berasal dari pakan. Bahan

pakan lokal diketahui memiliki ketersediaan yang melimpah karena mudah diperoleh di dalam negeri. Jenis bahan lokal dapat berasal dari tanaman, hewan, dan limbah (pertanian, peternakan, perkebunan dan industri pengolahannya). Hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan bahan baku lokal sebagai pakan ternak, yaitu: tidak bersaing dengan kebutuhan manusia, mudah diperoleh, dan dapat diproduksi secara kontinyu.

Kendala yang sering ditemukan dalam penggunaan bahan lokal yaitu tingginya kandungan serat dan adanya zat antinutrisi pada bahan pakan lokal. Senyawa antinutrisi berupa asam fitat banyak terkandung pada biji-bijian sumber pakan unggas (Yanuartono, Nururrozi, & Indarjulianto, 2017). Asam fitat ialah salah satu zat antinutrisi yang terdapat dalam pakan ternak. Asam fitat akan menghambat penyerapan nutrisi bagi ternak unggas. Adanya asam fitat memiliki efek antinutrisi yang kuat, hal ini didasarkan pada struktur molekul asam fitat yang mampu berikatan dengan kation divalent (P, K, Ca²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺), protein, dan karbohidrat (Kerovuo, von Weymarn, Povelainen, Auer, & Miasnikov, 2000) (Wang et al., 2014) (Yanuartono et al., 2017). Sehingga mineral tersebut menjadi tidak larut dan menyebabkan logam kation tersebut tidak tersedia sebagai faktor nutrisi (Bohn, Meyer, & Rasmussen, 2008).

Peningkatan nilai nutrisi pakan dapat dilakukan dengan cara penambahan enzim fitase yang berasal dari mikroorganisme. Nielsen et al., (1997) menyatakan bahwa fitase asal mikroba aktif (*Escheria coli* cellular, *Aspergillus*) di dalam saluran pencernaan mampu memperbaiki pencernaan mineral (P, K, Ca²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺) dan memperbaiki mineralisasi tulang serta mereduksi kandungan P dalam feses pada broiler (Shin, Ogburn, Varban, Gilbert, & Burd, 2001). Mikroba yang bermanfaat ini dapat dimanfaatkan sebagai probiotik. Probiotik merupakan organisme hidup yang bersifat non-patogenik dan menguntungkan bagi inangnya (Hotel & Cordoba, 2001).

Mikroorganisme yang dijadikan probiotik didapatkan melalui jalur isolasi, identifikasi dan karakterisasi. Tujuan identifikasi adalah untuk penentuan atau penetapan nama suatu makhluk hidup (Bin Masalam et al., 2018). Pada penelitian ini dilakukan uji fitase pada isolat bakteri AL01, RIL07, FA16, AN32 dan NS05 pada medium LB yang mengandung sodium fitat. Tujuan dilakukan penelitian ini untuk mengetahui kemampuan bakteri kandidat probiotik dalam memecah asam fitat dan menghasilkan enzim fitase.

Metode Penelitian

Pembuatan media LB cair dilakukan dengan menimbang *tryptone powder* (1%), NaCl (1%), *yeast extract* (0,5%) dari jumlah volume aquades yang digunakan kemudian dihomogenkan menggunakan *hot plate stirrer* dan diukur pH (7,2) (El-Toukhy, Youssef, & Mikhail, 2013). Media dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave*.

Media yang digunakan dalam melakukan uji fitase yaitu 1,5 g glukosa, 0,375 g NH₄NO₃, 0,0375 g MgSO₄:7H₂O, 0,0375 g KCl, 0,15 g CaCl₂:H₂O, 0,3 g Sodium Fitat dan 1,125 g Agar dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 75 ml aquades (pH 5,5).

Kemudian dipanaskan sambil dihomogenkan menggunakan *hot plate stirrer*. Sterilisasi dilakukan dengan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs. Setelah media disterilkan, media dituang pada cawan petri steril dan ditunggu membeku.

Hasil dan Pembahasan Karakterisasi bakteri

Hasil peremajaan isolate bakteri dengan kode isolate AL01, RIL07, FA16, AN32, dan NS05 (**Tabel 1**) diamati secara makroskopis. Karakterisasi morfologi berguna untuk mengetahui bentuk koloni, warna koloni, tepi koloni dan elevasi koloni bakteri yang dikultur. Perbedaan makroskopis dapat disebabkan karena perbedaan media tumbuh yang digunakan. Perbedaan makroskopis ini dapat dijadikan patokan awal dalam proses pemurnian bakteri. Berdasarkan hasil pengamatan morfologi koloni didapatkan bentuk bulat (100%). Warna koloni atau pigmentasi putih (60%) dan krem (40%). Tepi koloni ada yang rata (80%) dan bergerigi (20%). Elevasi berbentuk umbonate (20%) dan convex (80%).

Hasil penelitian Risna *et al.* (2020) melaporkan bahwa isolate bakteri asam laktat yang berasal dari saluran pencernaan entok memiliki karakteristik morfologi yang berbentuk bulat atau bergerigi atau timbul, memiliki warna putih sampai putih krim, permukaan koloni cembung dan umbonat, dan ukuran koloni yang beragam. Hasil penelitian lain juga menyatakan bahwa bakteri yang diisolasi dari saluran pencernaan entok yaitu *Pediococcus acidalactici*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus lactis*, dan *Lactobacillus murinus* (Xie *et al.*, 2015).

Setelah melakukan pengamatan morfologi secara makroskopis, dilakukan pengamatan morfologi secara mikroskopis dengan cara melakukan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui golongan bakteri. Berdasarkan pewarnaan Gram, karakteristik bakteri dibagi menjadi 2 kelompok yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif akan berwarna ungu dan bakteri Gram negatif berwarna merah. Selain itu, pengecatan Gram juga dilakukan untuk mengetahui bentuk sel bakteri (Holderman, de Queljoe, & Rondonuwu, 2017). Berdasarkan **Tabel 1**, hasil pengamatan sel bakteri dari pewarnaan Gram, diperoleh isolat bakteri AL01, RIL07, FA16, AN32, dan NS05 termasuk Gram positif (100%), berbentuk sel basil (batang) pada isolate kode AL01, RIL07 FA16, dan AN32 (80%). Adapun isolat NS05 memiliki bentuk sel *coccus* (bulat) (20%).

Berdasarkan hasil uji katalase menggunakan larutan hydrogen peroksida 3% menunjukkan semua isolate bakteri menunjukkan katalase negatif, ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung setelah ditetesi larutan hydrogen peroksida 3%. Enzim katalase mampu memecah hydrogen peroksida menjadi molekul air (H₂O) dan oksigen (H₂O) (Risa, Harimurti, & Widodo, 2020). Khalid (2011) melaporkan bahwa sebagian besar bakteri asam laktat menunjukkan katalase negatif. Bakteri asam laktat merupakan

bakteri yang bersifat anaerob dan tidak dapat mensintesis *cytochromes* dan enzim katalase (Goyal, Dhingra, Bajpai, & Joshi, 2012).

Proses identifikasi bakteri dilanjutkan dengan menggunakan media gula-gula. Kemampuan bakteri membentuk asam dari berbagai sumber karbon dapat diketahui dengan uji fermentasi gula-gula. Sebanyak 10 jenis gula-gula digunakan pada penelitian ini yaitu glukosa, rhamnosa, sukrosa, meltosa, arabinosa, dan laktosa (**Tabel 2**).

NO	KODE ISOLAT	H ₂ S	MOTILITAS	GAS DARI						
				GLU	GLUKOSA	RHAM	SUK	MAL	ARA	LAK
1	AL01	-	-	+	-	-	+	-	+	-
2	RIL07	-	-	+	-	+	+	+	+	-
3	FA16	-	-	+	-	+	+	+	+	+
4	AN32	-	-	+	-	-	+	-	-	+
5	NS05	-	-	+	-	+	+	-	+	+

Tabel 2. Profil Biokimia Bakteri Kandidat Probiotik

Hasil uji fermentasi gula-gula menunjukkan 5 isolat bakteri AL01, RIL07, FA16, AN32, dan NS05 tidak menghasilkan gas H₂S, indol negatif dan *non-motil*. Semua isolate bakteri mampu memfermentasi sukrosa dan glukosa menjadi asam tanpa menghasilkan gas dari glukosa. AL01 mampu memfermentasi glukosa, sukrosa dan arabinosa, tetapi tidak mampu memfermentasi rhamnosa, meltosa, dan laktosa. RIL07 mampu memfermentasi glukosa, rhamnosa, sukrosa, meltosa, dan arabinosa, tetapi tidak mampu memfermentasi laktosa. FA16 mampu memfermentasi semua jenis gula-gula yang diujikan. AN32 mampu memfermentasi glukosa, sukrosa, dan laktosa, tetapi tidak mampu memfermentasi rhamnosa, meltosa, dan arabinosa. Sedangkan NS05 mampu memfermentasi glukosa, rhamnosa, sukrosa, laktosa dan arabinosa, tetapi tidak mampu memfermentasi meltosa. Profil biokimia berkaitan erat dengan proses metabolisme pada tubuh bakteri (TUGAS & ARRACHMAN, n.d.).

3.2 Verifikasi Bakteri Penghasil Enzim Fitase

Hasil uji fitase menggunakan medium yang mengandung sodium fitat menghasilkan *clearing zone* atau zona bening di sekitar koloni yang tumbuh pada medium (**Gambar 1**). Hal ini menandakan isolate AL01 (A), RIL07 (B), FA16 (C), AN32 (D), dan NS05 (K) memiliki aktifitas dalam memecah asam fitat.



Gambar 1 Hasil uji fitase bakteri AL01 (A), RIL07 (B), FA16 (C), AN32 (D), dan NS05 (K) pada medium sodium fitat.

Hasil uji fitase ini menunjukkan bahwa bakteri AN32, FA16, dan NS05 memiliki *clearing zone* (zona bening) lebih besar (d ; 1,9 cm) dibandingkan isolat AL01 (d ; 1,5 cm), dan isolat RIL07 (d ; 1,6 cm). Perbedaan diameter pada setiap isolat disebabkan karena perbedaan kemampuan isolat dalam menghidrolisis asam fitat menjadi fosfor. mikroorganisme yang menghasilkan fitase ekstraseluler mampu menghidrolisis asam fitat menjadi fosfor sehingga wilayah di sekeliling koloni terlihat jernih. Fosfor yang dihasilkan dari proses penguraian asam fitat ini larut dalam media sehingga kekeruhan di sekeliling koloni hilang.

Enzim fitase yang dihasilkan oleh bakteri umumnya dikategorikan ke dalam bentuk beta protein (Porto, Kuniyoshi, Azevedo, Vitolo, & Oliveira, 2017). Hasil penelitian sebelumnya melaporkan jenis bakteri penghasil enzim fitase ialah *Bacillus subtilis* (Shimzu, 1992), *Bacillus coagulans* (Lee, Kwon, Koo, Kang, & Kim, 2006), *Bacillus amyloliquefaciens* dan *Lactobacillus sanfranciscensis*. Suplementasi bakteri penghasil enzim fitase pada bahan pakan ternak akan membantu mengoptimalkan penyerapan mineral yang terkandung dalam bahan pakan. Hasil penelitian Adegbehiningbe (2015) melaporkan bahwa penggunaan beberapa bakteri mampu menurunkan kandungan asam fitat pada campuran sorgum dan kentang dengan kisaran 50,5 – 61,3 %.

3.3 Pengukuran Biomassa Isolat Bakteri Penghasil Enzim Fitasi pada Berbagai Media

Berdasarkan hasil Analisis Sidik Ragam (ANOVA) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) terhadap berat pelet isolat bakteri penghasil enzim fitase pada media LB, limbah tempe glukosa dan limbah tempe molasses (Tabel 4).

Tabel 4. Produksi Biomassa Bakteri Penghasil Enzim Fitase pada Berbagai Media

No	Isolat	Berat Pellet pada Berbagai Media (\pm STDV)		
		LB (g)	Limbah Tempe Glukosa (g)	Limbah Tempe Molases (g)
1.	AL01	0.05 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02
2.	RIL07	0.05 \pm 0.03	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
3.	FA16	0.05 \pm 0.02	0.05 \pm 0	0.03 \pm 0.01
4.	AN32	0.05 \pm 0.01	0.05 \pm 0.03	0.03 \pm 0.01
5.	NS05	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02

Pada Tabel 4 menunjukkan isolat bakteri AL01, RIL07, FA16, AN32 memiliki berat pelet rata-rata yang sama pada media LB yaitu 0,05 g/ml dan bakteri NS05 sebesar 0,03 g/ml. Rata-rata berat pelet isolat AL01, RIL07, FA16, AN32 dan NS05 pada media limbah tempe glukosa hampir sama pada media LB sekitar 0,04 g/ml dan 0,05 g/ml. Pada media limbah tempe molases, isolat memiliki rata-rata berat pelet sebesar 0,03 g/ml sedangkan isolat bakteri NS05 sebesar 0,04 g/ml. Pertumbuhan biomassa akan terus meningkat sampai titik maksimal seiring

pertambahan waktu, dan akan menurun karena terjadi penuaan dan kematian bakteri .

Berdasarkan uraian di atas maka media alternatif limbah tempe glukosa dan molases layak untuk digunakan sebagai media tumbuh isolat bakteri penghasil enzim fitase karena kandungan yang dimiliki oleh limbah tempe yaitu protein, lemak, air, dan beberapa mineral lainnya. Kandungan nutrisi pada limbah gula (molases) yang cukup tinggi dapat menumbuhkan bakteri dengan baik. Adanya kandungan nutrisi yang terkandung di dalam masing-masing media akan meningkatkan kemampuan tumbuh isolat bakteri penghasil enzim fitase.

Kesimpulan

Isolat bakteri AL01, RIL07, FA16, AN32, dan NS05 teridentifikasi sebagai penghasil enzim fitase yang ditandai adanya *clearing zone* (zona bening) disekitar koloni isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media yang mengandung asam fitat.

BIBLIOGRAFI

- Bin Masalam, Maged S., Bahieldin, Ahmed, Alharbi, Mona G., Al-Masaudi, Saad, Al-Jaouni, Soad K., Harakeh, Steve M., & Al-Hindi, Rashad R. (2018). Isolation, molecular characterization and probiotic potential of lactic acid bacteria in Saudi raw and fermented milk. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
- Bohn, Lisbeth, Meyer, Anne S., & Rasmussen, Søren. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(3), 165–191.
- El-Toukhy, Nabil M. K., Youssef, Amany S., & Mikhail, Mariam G. M. (2013). Isolation, purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* MJA. *African Journal of Biotechnology*, 12(20).
- Goyal, Renuka, Dhingra, Harish, Bajpai, Pratima, & Joshi, Navneet. (2012). Characterization of the *Lactobacillus* isolated from different curd samples. *African Journal of Biotechnology*, 11(79), 14448–14452.
- Holderman, Michelle V, de Queljoe, Edwin, & Rondonuwu, Sendy B. (2017). Identifikasi bakteri pada pegangan eskalator di salah satu pusat perbelanjaan di kota Manado. *Jurnal Ilmiah Sains*, 17(1), 13–18.
- Hotel, Amerian Córdoba Park, & Cordoba, A. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5(1), 1–10.
- Kerovuo, Janne, von Weymarn, Niklas, Povelainen, Mira, Auer, Sanna, & Miasnikov, Andrei. (2000). A new efficient expression system for *Bacillus* and its application to production of recombinant phytase. *Biotechnology Letters*, 22(16), 1311–1317.
- Lee, Seung Hun, Kwon, Hyuk Sang, Koo, Kyo Tan, Kang, Byung Hwa, & Kim, Tae Yong. (2006). Characterization of phytase from *Bacillus coagulans* IDCC 1201. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 34(1), 28–34.
- Porto, Maria Carolina W., Kuniyoshi, Tais Mayumi, Azevedo, P. O. S., Vitolo, Michele, & Oliveira, R. P. Souza. (2017). *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances*, 35(3), 361–374.
- Risa, Yayuk Kurnia, Harimurti, Sri, & Widodo, Widodo. (2020). Screening for probiotic of lactic acid bacteria isolated from the digestive tract of a native Aceh duck (*Anas platyrhynchos*). *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(7).
- Shin, Marcus E., Ogburn, Kenyon D., Varban, Oliver A., Gilbert, Penney M., & Burd, Christopher G. (2001). FYVE domain targets Pib1p ubiquitin ligase to endosome and vacuolar membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 41388–41393.
- TUGAS, I., & ARRACHMAN, KHAIRUNNISA. (n.d.). *MIKROBIOLOGI PEWARNAAN*.

Wang, Lei, Yang, Yuxin, Cai, Bei, Cao, Pinghua, Yang, Mingming, & Chen, Yulin. (2014). Coexpression and secretion of endoglucanase and phytase genes in *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(7), 12842–12860.

Xie, Z. L., Bai, D. P., Xie, L. N., Zhang, W. N., Huang, X. H., & Huang, Y. F. (2015). Intestinal lactic acid bacteria from Muscovy duck as potential probiotics that alter adhesion factor gene expression. *Genetics and Molecular Research*, *14*(4), 12262–12275.

Yanuartono, Yanuartono, Nururrozi, Alfarisa, & Indarjulianto, Soedarmanto. (2017). Fitat dan fitase: dampak pada hewan ternak. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan (Indonesian Journal of Animal Science)*, *26*(3), 59–78.

Copyright holder:

Zaid Al Gifari, Khairil Anwar, Anwar Rosyidi, Muhamad Ali, Muhamad Amin (2022)

First publication right:

Syntax Literate: Jurnal Ilmiah Indonesia

This article is licensed under:

