

Isolasi dan Penapisan Mikroba untuk Probiotik Unggas dan Pertumbuhannya pada Berbagai Sumber Gula

TRESNAWATI PURWADARIA, I. PUTU KOMPIANG, JINADASA DARMA, SUPRIYATI, dan EMI SUDJATMIKA

Balai Penelitian Ternak, PO BOX 221, Bogor 16002

(Diterima dewan redaksi tanggal 9 Juli 2003)

ABSTRACT

PURWADARIA, T., I-P. KOMPIANG, J. DARMA, SUPRIYATI, and E. SUDJATMIKA. 2003. Isolation and Screening of Microbes for Poultry Probiotics and Their Growth on Different Sugar Resources. *JITV* 8(2): 76-83.

The microorganism used as probiotics must be bio-safety, could be cheaply and easily produced, and suitable with the environment of the digestive track. Isolation was carried out from commercial culture (containing mixture of *Bacillus* spp.), digestive tract (proventriculus, small intestine and large intestine) of local and broiler chickens, and commercial yoghurts (fermented milk). Neutral and acidic nutrient agars (NA) were used as the media at room temperature and in the aerobic or anaerobic conditions. Separate colonies were isolated, stained with Gram and spore staining and observed under the microscope. The bacteria which were Gram positive bacillus and can form spores were further identified. Eight different species of *Bacillus* spp.: *B. laterosporus*, *B. coagulans*, *B. alvei*, *B. circulans*, *B. brevis*, *B. bodius*, *B. pasteurii*, and *B. macroides* were isolated from the commercial mixture. From the digestive tracts of local and broiler chickens, 13 bacteria and 2 yeasts were isolated, while 5 yeast were obtained from two commercial yoghurts. Those bacteria were facultative aerobic and only grew in neutral condition and not in acidic condition (pH 4.5), while the yeast were either facultative anaerobic also can grow in pH neutral and 4.5. The ability of each isolates to grow in the media containing mixture of minerals and glucose, sucrose or molasses were evaluated. Incubation was carried out in the shaker incubator at 40°C, 150 rpm for 48 hours. Dry matter of the biomass was determined as the growth parameter. All isolates of bacteria and yeast can grow in the substrate containing glucose, sucrose and molasses. Variance analyses show that there were interactions between kind of bacteria and carbon source or between kind of yeast and carbon source ($P < 0.05$). Three isolates of bacteria that had highest production of biomass were *B. coagulans* on sucrose (the third for molasses), Sp. 9 on glucose, and *B. apiarius* on sucrose (the sixth on molasses). *B. apiarius* isolated from digestive tract of local chicken will be useful to be developed as probiotics. The highest production of yeast was the control *Saccharomyces cerevisiae* on three sugars. Between the isolates from digestive tract of local chicken, *Toluraspota delbrueckii* AL-15 produced 13.8×10^{-1} mg/ml biomass on molasses.

Key words: Poultry probiotics, bacterial and yeast isolates, glucose, sucrose, molasses

ABSTRAK

PURWADARIA, T., I-P. KOMPIANG, J. DARMA, SUPRIYATI, dan E. SUDJATMIKA. 2003. Isolasi dan Penapisan Mikroba untuk Probiotik Unggas dan Pertumbuhannya pada Berbagai Sumber Gula. *JITV* 8(2): 76-83.

Mikroorganisme yang digunakan sebagai probiotik harus dinyatakan *biosafety* (layak biologis), dapat diproduksi dengan mudah dan murah, dan cocok dengan lingkungan pencernaan unggas. Isolasi mikroba dilakukan dari kultur dagang campuran *Bacillus* spp., saluran pencernaan (proventrikulus, usus kecil, dan usus besar) ayam lokal dan pedaging hibrid, serta yoghurt yang diperdagangkan. Agar-agar kaldu netral dan asam (pH 4.5) digunakan sebagai media pada lingkungan aerob dan anaerob. Koloni yang terpisah diisolasi dan diwarnai dengan pewarna Gram dan spora dan diamati di bawah mikroskop. Bakteri yang bersifat gram-positif batang, dan dapat membentuk spora diidentifikasi lebih lanjut. Delapan species yang berbeda: *B. laterosporus*, *B. coagulans*, *B. alvei*, *B. circulans*, *B. brevis*, *B. bodius*, *B. pasteurii*, dan *B. macroides* diisolasi dari kultur dagang campuran *Bacillus* spp. Dari saluran pencernaan ayam lokal dan pedaging hibrid diperoleh 13 bakteri dan 2 khamir, sedangkan 5 khamir diperoleh dari yoghurt yang diperdagangkan. Seluruh bakteri yang didapat bersifat fakultatif anaerob dan hanya tumbuh pada pH netral, dan tidak pada suasana asam (pH 4,5), sedangkan khamir dapat tumbuh pada suasana netral dan asam. Kemampuan pertumbuhan setiap isolat dievaluasi pada media campuran mineral dan sumber gula (glukosa, sukrosa atau molasses). Inkubasi dilakukan pada inkubator bergoyang, pada suhu 40°C, 150 rpm selama 48 jam. Berat kering biomassa ditentukan sebagai parameter. Seluruh isolat bakteri dan khamir dapat tumbuh pada glukosa, sukrosa atau molases. Analisis varians menunjukkan terjadi interaksi antara jenis mikroba dan sumber karbon ($P < 0,05$). Tiga bakteri yang memproduksi biomassa tertinggi berturut-turut: *B. coagulans* pada sukrosa (urutan ketiga pada molases), Sp. 9 pada glukosa, dan *B. apiarius* pada sukrosa (urutan keenam pada molases). *B. apiarius* yang diisolasi dari saluran pencernaan dapat dikembangkan sebagai probiotik. Produksi tertinggi sel khamir didapatkan pada kontrol *Saccharomyces cerevisiae* pada ketiga macam gula. Di antara isolat khamir yang diisolasi dari saluran pencernaan ayam lokal *Toluraspota delbrueckii* AL-15 pada molases menghasilkan biomassa $13,8 \times 10^{-1}$ mg/ml.

Kata kunci: Probiotik unggas, isolat bakteri dan khamir, glukosa, sukrosa, molases

PENDAHULUAN

Masalah utama dalam peningkatan produksi ternak termasuk unggas adalah penyediaan pakan. Pada saat ini penyediaan pakan terutama sebagai sumber protein dan energi dipenuhi dari impor dan sebagai konsekuensinya harga pakan meningkat. Efisiensi penggunaan pakan dapat dilakukan dengan pemberian bahan imbuhan (*feed additive*) atau zat pemacu tumbuh (*growth promotant*). Zat pemacu tumbuh yang umum dipakai berasal dari kelompok antibiotika seperti zink-basitrasin, monensin, tetrasiklin dan penisilin. Perkembangan persyaratan keamanan pangan membatasi penggunaan antibiotika karena selain sifat positifnya yang menahan infeksi bakteri patogen, juga membunuh bakteri mikroba pencernaan yang menguntungkan, dan menyebabkan resistensi. Oleh karena itu, saat ini para pakar nutrisi mengalihkan penggunaan zat pemacu dengan bahan alami lain seperti bioaktif dan probiotik.

Probiotik didefinisikan sebagai kultur hidup satu macam mikroba atau lebih yang diberikan pada manusia atau hewan untuk mikroflora pencernaan (HAVENAAR *et al.*, 1992). Jenis mikroba tersebut harus sudah dinyatakan sebagai yang aman digunakan sebagai bahan pakan atau pangan. Penggunaan probiotik pada ternak telah dilaporkan berfungsi sebagai: (i) zat pemacu tumbuh, (ii) meningkatkan konversi pakan, (iii) kontrol kesehatan atau pencegahan mikroba patogen terutama untuk ternak usia muda, dan (iv) pengurai faktor antinutrisi seperti antitripsin (HAVENAAR *et al.*, 1992).

Jenis mikroba yang digunakan sebagai probiotik sangat terkait pada sifat kimia dan fisik lingkungan pencernaan. Sebagian organ pencernaan unggas (tembolok, proventrikulus, dan rempela) mempunyai keasaman yang tinggi, oleh karena itu mikroba yang digunakan harus tahan terhadap asam. Selain itu saluran pencernaan juga bersifat anaerob, sehingga hanya mikroba yang anaerob fakultatif atau obligat yang dapat hidup pada lingkungan tersebut. Pada umumnya mikroba yang digunakan pada unggas dapat berupa bakteri asam laktat atau dari kelompok khamir (MARTIN, 1995; HADDADIN *et al.*, 1996; JIN *et al.*, 1996a). *B. subtilis* sudah pula dicobakan pada ayam pedaging dan memberikan hasil yang positif (JIN *et al.*, 1996b). Bakteri *Bacillus* tidak umum ditemukan pada saluran pencernaan tetapi mempunyai kemampuan untuk pengontrolan bakteri patogen (sebagai *competitive exclusion*) (BARROW, 1992). Kelompok bakteri ini selain mempunyai kemampuan membentuk spora, juga dapat menghasilkan enzim yang berguna dalam pencernaan seperti amilase dan protease. Jenis khamir yang telah digunakan sebagai probiotik unggas adalah *Saccharomyces cerevisiae* baik pada breeder ayam pedaging (MARTIN, 1995), maupun kalkun

(HAYAT *et al.*, 1993), serta pertumbuhan ayam pedaging (KOMPIANG, 2002). Telah dilaporkan oleh THAYER *et al.* (1978) bahwa pemberian khamir dapat meningkatkan efisiensi penggunaan fosfor.

Penggunaan probiotik akan berkaitan dengan kestabilan kehidupan mikroba. Mikroba anaerob obligat akan tumbuh baik pada lingkungan pencernaan tetapi produksi dan pengawetan mikroba akan lebih sulit daripada mikroba aerob. Mikroba anaerob fakultatif akan lebih menguntungkan karena bersifat efektif sebagai probiotik dan dapat diproduksi dengan cepat sebagai mikroba aerob.

Proses produksi sel untuk digunakan sebagai probiotik harus diperhatikan supaya dapat menguntungkan sebagai hasil industri. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba terdiri atas faktor lingkungan yang terdiri dari suhu, pH, oksigen, tekanan osmosis, dan faktor kebutuhan nutrisi yang terdiri dari sumber karbon, nitrogen, mineral (unsur makro dan mikro), dan vitamin (STAINER *et al.*, 1976; FARDIAZ, 1989). Pertumbuhan mikroba dapat mencapai optimal bila keadaan lingkungan disesuaikan dengan sifat mikroba. Sebagai contoh pada pertumbuhan mikroba aerob, faktor oksigen menjadi faktor utama, sedangkan suhu lingkungan juga disesuaikan dengan sifat mikroba. Mikroba mesofilik dapat tumbuh pada suhu 28-30°C, sedangkan mikroba termofilik hanya dapat tumbuh pada suhu tinggi, yaitu di atas 45°C. Kebutuhan sumber karbon untuk pertumbuhan mikroba tergantung pada jenis mikroba. Kelompok mikroba yang mengandung klorofil dapat menggunakan CO₂ sebagai sumber karbon (kelompok protobakteria seperti *Rhodobacter*), sedangkan kebanyakan mikroba tidak mengandung klorofil. Kelompok ini memerlukan senyawa organik sebagai sumber karbon dan senyawa yang diperlukan tergantung jenis mikrobanya. Kelompok selulolitik dapat memanfaatkan selulosa, sedangkan amilolitik memanfaatkan pati (FARDIAZ, 1989). Walaupun senyawa polimer karbohidrat dapat dipergunakan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan, produksi sel yang paling baik diperoleh dari sumber karbohidrat dapat larut seperti glukosa. Namun, penggunaan glukosa memerlukan biaya tinggi, oleh karena itu untuk produksi sel, pada umumnya digunakan sumber karbon lain seperti molases.

Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi mikroba dari saluran pencernaan ayam lokal (tanpa penggunaan antibiotika) dan ayam pedaging hibrid (dengan penggunaan antibiotika), minuman susu fermentasi, dan kultur dagang campuran *Bacillus* spp. yang mungkin dapat dipergunakan sebagai probiotik. Penapisan dilakukan pada jenis mikroba, berdasarkan kecocokan sifat pertumbuhan pada saluran pencernaan, kecepatan pertumbuhan, dan sumber gula.

MATERI DAN METODE

Sumber isolat

Sumber isolat terutama dilakukan dari saluran pencernaan ayam baik ayam lokal maupun hibrid (broiler). Daerah saluran pencernaan yang diisolasi mulai dari proventrikulus, usus besar dan kecil. Selain itu diisolasi pula dari kultur dagang campuran *Bacillus* spp. dan dua jenis yoghurt yang diperdagangkan di Bandung (Cisangkuy dan LIPI). Sebagai kontrol digunakan *B. subtilis* (LIPI) dan *B. macroides* (Balitvet). Kemudian setelah berhasil diisolasi beberapa khamir digunakan pula *S. cerevisiae* (Balitvet) sebagai kontrol khamir.

Metode isolasi

Isolasi dilakukan dengan melarutkan isi saluran pencernaan bersama organnya dalam larutan pepton 1% yang mengandung 0,1% agar-agar. Larutan tersebut digesekkan pada medium *nutrient agar* (agar-agar kaldu/NA) yang bersifat netral dan asam pada suhu ruang dalam suasana aerob dan anaerob. Suasana asam didapatkan dengan penambahan asam laktat sebanyak 0,5 ml dalam 500 ml NA hingga pH medium menjadi 4,5. Pertumbuhan anaerob dilakukan pada jar anaerob (bebas oksigen). Koloni mikroba yang terpisah ditanamkan pada agar-agar NA miring untuk uji karakteristik dan pertumbuhan lebih lanjut.

Penentuan karakteristik mikroba

Penentuan karakteristik bentuk mikroba dilakukan dengan pengamatan mikroskopik dengan pewarnaan Gram (COWAN, 1975). Pada isolat bakteri Gram positif kemudian dilakukan kemampuan pembentukan spora dengan pewarnaan *malachite green* dan safranin (COWAN, 1975).

Sifat pertumbuhan kultur mikroba

Hasil isolat dari mikroba anaerob ditumbuhkan pada aerob, sedangkan pada aerob diujikan kemampuan pertumbuhannya pada anaerob. Demikian pula pada isolat asam ditanamkan pada lingkungan netral dan sebaliknya.

Penentuan berat kering sel

Penentuan berat kering sel dilakukan dengan substrat cair yang merupakan campuran mineral PM dengan tiga macam sumber karbon yaitu glukosa, sukrosa dan molases 1%. Kultur diinkubasi secara aerob pada inkubator bergoyang 150 rpm pada suhu 40°C (suhu tubuh ayam) selama 48 jam. Berat kering

ditentukan pada 3 ml kultur tersebut dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit dan dibilas 1 kali dengan air suling. Hasil sentrifus dikeringkan pada 105°C dan bobot kering diperhitungkan dalam mg/10ml kultur.

Analisis data

Pengolahan data dilakukan pada penentuan berat kering sel, dengan analisis varians yang dirancang berupa sidik ragam pola faktorial 18 x 3, dimana faktor utama merupakan 18 jenis isolat bakteri sedangkan tiga jenis sumber karbon merupakan sub-faktor (STEEL dan TORRIE, 1980). Pada analisis pertumbuhan khamir, faktor utama berupa enam jenis isolat dan tiga jenis sumber karbon yang sama merupakan subfaktor.

Identifikasi bakteri

Identifikasi mikroba yang berprospek sebagai probiotik yaitu yang bersifat gram positif batang dan berspora dikirimkan ke laboratorium identifikasi Balai Penelitian Veteriner dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Mikrobiologi Institut Teknologi Bandung. Identifikasi dilakukan berdasarkan uji morfologis dan fisiologis (biokimia) mengikuti uji kunci Bergey (BUCHANAN dan GIBBONS, 1974) dan COWAN (1975). Identifikasi khamir dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Universitas Indonesia berdasarkan uji morfologis dan biokimia (KRAGER-VAN RIJ, 1984).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari awal penelitian isolasi lebih ditujukan pada isolasi bakteri kelompok basili, oleh karena itu medium agar-agar kaldu digunakan untuk isolasi. Walaupun demikian penggunaan medium umum ini tidak melepaskan kemungkinan terdapatnya bakteri kelompok lain atau khamir. Isolasi dari kultur dagang campuran *Bacillus* spp. mendapatkan delapan isolat dengan species yang berbeda (Tabel 1) sesuai dengan hasil laporan identifikasi yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi ITB. Sifat isolat sesuai dengan bakteri kontrol *B. subtilis* (LIPI) dan *B. licheniformis* (Balitvet). Pada saluran pencernaan ayam lokal telah berhasil diisolasi 9 bakteri dan 2 khamir, sedangkan dari ayam hibrid 6 bakteri (Tabel 1 dan 2). Keadaan yang terakhir menunjukkan, walaupun pemeliharaan ayam hibrid menggunakan antibiotika, saluran pencernaan masih mengandung bakteri yang beragam. Hasil isolat bakteri dari saluran pencernaan menunjukkan keragaman bakteri dengan bentuk kokus dan batang (Tabel 1) dan dengan pewarnaan Gram terdapat hasil positif dan negatif. Salah satu isolat berbentuk batang dan Gram positif ditampilkan pada

Gambar 1. Hasil uji mikroskopis dan uji fisiologis lebih lanjut menunjukkan dari kelompok bakteri hanya 2 yang merupakan genus *Bacillus*, *B. apiarius* dari ayam lokal dan *B. alvei* dari ayam hibrid.

Kedua jenis isolat khamir yang didapatkan dari saluran pencernaan ayam (AL-15 dan AL-16) menunjukkan pembentukan *budding* (Gambar 2) dan terlihat hampir mempunyai ukuran sel yang hampir

sama hanya pada pengamatan melalui mikroskop terlihat AL-16 mempunyai ukuran sel yang lebih besar dan lebih rapat. Hasil identifikasi lebih lanjut pada Laboratorium Mikrobiologi UI menunjukkan berspecies sama yaitu *Torulaspota delbruickii*, untuk membedakan diberi nomor AL-15 dan AL-16 (Tabel 2). Hasil identifikasi salah satu isolat dari yoghurt merupakan *Saccharomyces kluyveri* YC-22.

Tabel 1. Hasil isolasi dan karakteristik bakteri

Jenis isolat	Sumber isolat	Pertumbuhan				Karakteristik		
		Aerob	Anaerob	pH Netral	pH Asam	Bentuk	Gram	Spora
<i>B. laterosporus</i>	KD	+	+	+	-	batang	pos	S
<i>B. coagulans</i>	KD	+	+	+	-	batang	pos	S
<i>B. circulans</i>	KD	+	+	+	-	batang	pos	S
<i>B. alvei</i>	KD	+	+	+	-	batang	pos	S
<i>B. brevis</i>	KD	+	+	+	-	batang	pos	S
<i>B. bodius</i>	KD	+	+	+	-	batang	pos	S
<i>B. pasteurii</i>	KD	+	+	+	-	batang	pos	S
<i>B. macroides</i>	KD	+	+	+	-	batang	pos	S
Sp. 9	AL-P	+	+	+	-	kokus	neg	-
<i>B. apiarius</i>	AL-P	+	+	+	-	batang	pos	S
Sp. 11	AL-UB	+	+	+	-	kokus	neg	-
Sp. 12	AL-UB	+	+	+	-	batang	neg	-
Sp. 13	AL-UB	+	+	+	-	kokus	pos	-
Sp. 14	AL-UB	+	+	+	-	kokus	pos	-
Sp. 17	AL-UK	+	+	+	-	batang	neg	-
Sp. 18	AL-UB	+	+	+	-	batang	neg	-
Sp. 19	AL-UB	+	+	+	-	batang	neg	-
<i>B. licheniformis</i>	Balitvet	+	+	+	-	batang	pos	S
<i>B. subtilis</i>	LIPI	+	+	+	-	batang	pos	S
Sp. 29	H-P	+	+	+	-	kokus	neg	-
Sp. 30	H-UB	+	+	+	-	kokus	neg	-
Sp. 31	H-UK	+	+	+	-	kokus	pos	-
Sp. 32	H-UB	+	+	+	-	batang	neg	-
Sp. 33	H-UB	+	+	+	-	batang	neg	-
<i>B. alvei</i>	H-UB	+	+	+	-	batang	pos	S

KD: kultur dagang; AL: ayam lokal; H: ayam hibrid; P: proventrikulus; UB: usus besar; UK: usus kecil (intestin)

+: tumbuh; - tidak tumbuh; pos: positif; neg: negatif; LIPI: Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia; Balitvet: Balai Penelitian Veteriner

Tabel 2. Hasil isolasi dan karakteristik pertumbuhan khamir

Jenis isolat	Sumber isolat	Ukuran sel (mm)		Budding	pH asam*	pH netral	Aerob	Anaerob
		Panjang	Lebar					
<i>T. delbrueckii</i> AL-15	AL-UB	5,0-6,3	2,5-5,0	B	+	+	+	+
<i>T. delbrueckii</i> AL-16	AL-P	5,0-7,5	3,8-5,0	B	+	+	+	+
Sp. 20	Yog-Ci	6,0-9,0	2,5-5,0	B	+	+	+	+
Sp. 21	Yog-Ci	5,5-8,8	2,8-5,5	B	+	+	+	+
<i>S. kluyveri</i> YC-22	Yog-Ci	7,5-10,0	2,5-5,0	B	+	+	+	+
Sp. 23	Yog-LIPI	7,5-9,0	3,0-4,0	B	+	+	+	+
Sp. 25	Yog-LIPI	6,5-11,0	3,5-5,5	B	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	Balitvet	5,6-8,8	4,3-5,0	B	+	+	+	+

* Pengujian pertumbuhan dalam keadaan asam diperoleh pada lingkungan anaerob

AL: ayam lokal; P: proventrikulus; UB: usus besar; Yog: yoghurt; Ci: cisangkuy; B: pembiakan membentuk *budding*; +: tumbuh; - tidak tumbuh; LIPI: Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

Keragaman bakteri pada saluran pencernaan sesuai dengan yang telah dilaporkan pada beberapa pustaka ditemukan *E. coli* (batang negatif) dan khamir (BARROW, 1992). Ketidakberhasilan isolasi bakteri kelompok asam laktat, bakteri berbentuk batang, Gram positif dan tidak berspora (*Lactobacillus*) karena tidak dipergunakan medium untuk bakteri asam laktat. Keberhasilan diisolasinya *B. apiarius* dan *B. alvei* merupakan hal positif karena mampu berspora sehingga dapat menyesuaikan diri pada lingkungan yang tidak cocok untuk tumbuhnya. Selain itu telah dilaporkan pula bahwa kelompok bakteri ini dapat digunakan sebagai probiotik dan meningkatkan kinerja ayam pedaging (JIN *et al.*, 1996b) dan dapat berkompetitif dengan bakteri patogen seperti *Salmonella* (BARROW, 1992). Pada identifikasi ditemukan bakteri kelompok basili yang dapat memproduksi amilase dan protease, sehingga terdapat kemungkinan berperan dalam pencernaan pakan. Isolat basili dari kultur dagang juga dapat dimanfaatkan sebagai probiotik pada ayam petelur. Pemberian *Bacillus* spp. yang dicampurkan dalam pakan, dilaporkan dapat meningkatkan produksi telur dan FCR (KOMPIANG, 2000).

Hasil isolasi juga menunjukkan bahwa isolat bakteri bersifat anaerob fakultatif yang menguntungkan karena dapat diproduksi dengan mudah untuk digunakan sebagai probiotik dan dapat hidup pada saluran pencernaan. Seluruh isolat bakteri tidak mampu tumbuh pada lingkungan asam, sedangkan khamir dapat. Hal ini memungkinkan khamir menjadi mikroba tembolok dan proventrikulus, sedangkan bakteri menempati daerah usus kecil dan besar. Isolat *B. apiarius* diisolasi dari proventrikulus walaupun tidak tumbuh pada lingkungan asam mungkin karena bakteri ini dapat membentuk spora dan bercampur dengan isi saluran pencernaan.

Keberhasilan isolasi sel khamir merupakan hal yang positif karena selain anaerob fakultatif kelompok ini juga umum digunakan sebagai probiotik (HAYAT *et al.*,

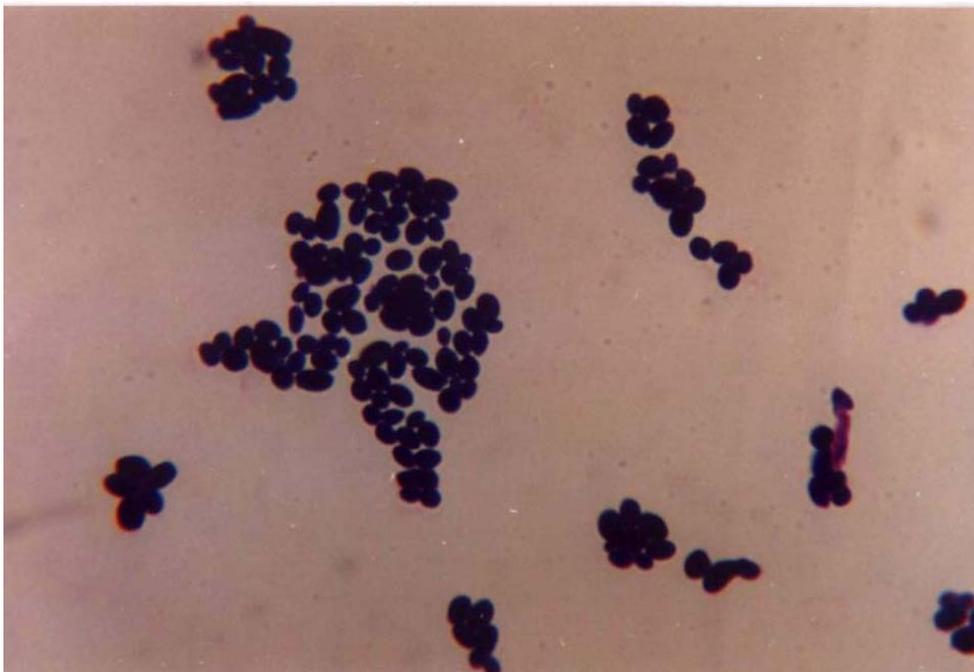
1993; MARTIN, 1995). Penggunaan khamir pada probiotik ini juga bermanfaat karena bukan golongan bakteri sehingga pada tipe liarnya tahan terhadap antibiotik yang biasa diberikan pada ayam sebagai zat pemacu tumbuh. Isolat khamir ditemukan pula pada dua sumber yoghurt Cisangkuy dan LIPI. Hal ini ternyata sesuai dengan pendapat yang mengatakan inokulum yoghurt mengandung khamir dan berperan dalam pembentukan aroma yang baik (ARRIYANTI, komunikasi pribadi).

Penggunaan mikroba sebagai probiotik akan bersifat ekonomis kalau dapat tumbuh dengan baik pada sumber karbon yang mudah didapat dan berharga rendah seperti sukrosa dan molases. Isolat bakteri dan khamir yang didapatkan, dipelajari kemampuannya pertumbuhannya pada substrat tersebut dan sebagai bahan pembanding digunakan glukosa yang telah diketahui mudah diserap sel sebagai sumber energi penghasil ATP (adenosin trifosfat). Ketiga sumber karbon dapat digunakan untuk pertumbuhan bakteri (Tabel 3). Kemampuan molases sebagai sumber karbon yang baik menguntungkan karena molases merupakan hasil ampas tebu sehingga tidak terlalu mahal dan mengandung zat pengaya seperti vitamin.

Hasil analisis pada pertumbuhan bakteri juga menunjukkan terjadi interaksi ($P < 0,05$) antara jenis sumber karbon dan jenis isolat. Lima isolat bakteri secara berurutan yang memberikan produksi biomassa kering tertinggi ialah: *B. coagulans* pada sukrosa (urutan ketiga pada molases), Sp. 9 pada glukosa, *B. apiarius* pada sukrosa (urutan keenam pada molases), *B. macroides* pada molases dan Sp. 13 pada glukosa. Hasil ini juga menunjukkan bahwa kelompok basili dapat dengan mudah diproduksi pada sukrosa atau molases dan hasil isolasi dari saluran pencernaan ayam *B. apiarius* termasuk yang terbaik. Bakteri hasil isolasi juga menunjukkan produksi biomassa yang lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri kontrol *B. subtilis*.



Gambar 1. Pewarnaan gram positif bakteri berbentuk batang *B. apiarius* isolat dari proventrikulus ayam lokal, (perbesaran 10 x 100)



Gambar 2. Isolat khamir *T. delbrueckii* AL15 dari usus besar ayam lokal (perbesaran 10 x 100)

Tabel 3. Produksi biomassa isolat bakteri pada berbagai sumber karbon

Bakteri	Biomassa ($\times 10^{-1}$ mg/ml) pada sumber karbon		
	Glukosa	Sukrosa	Molases
<i>B. laterosporus</i>	12,0 ^{bc}	6,3 ^{ab}	4,8 ^a
<i>B. coagulans</i>	12,9 ^{bc}	40,2 ^f	27,5 ^e
<i>B. circulans</i>	12,3 ^{bc}	19,9 ^c	18,7 ^e
<i>B. alvei</i>	4,8 ^a	14,6 ^{bc}	6,7 ^{ab}
<i>B. brevis</i>	5,6 ^a	13,9 ^{bc}	9,7 ^{ab}
<i>B. bodius</i>	6,6 ^{ab}	15,3 ^{bc}	7,6 ^{ab}
<i>B. pasteurii</i>	7,3 ^{ab}	6,5 ^{ab}	5,9 ^a
<i>B. macroides</i>	19,0 ^c	17,7 ^c	24,9 ^d
Sp. 9	33,3 ^e	15,6 ^{bc}	13,8 ^{bc}
<i>B. apiarius</i>	11,7 ^b	27,3 ^d	22,0 ^{cd}
Sp. 11	12,1 ^{bc}	10,1 ^{ab}	13,0 ^{bc}
Sp. 13	19,3 ^{cd}	12,9 ^{bc}	14,6 ^{bc}
Sp. 14	12,3 ^{bc}	17,7 ^c	17,7 ^c
Sp. 18	9,8 ^{ab}	18,8 ^c	14,4 ^{bc}
<i>B. subtilis</i>	6,0 ^a	6,5 ^{ab}	7,9 ^{ab}
Sp. 30 (broiler)	6,5 ^{ab}	5,7 ^a	6,4 ^{ab}
Sp. 31 (broiler)	6,1 ^{ab}	13,1 ^{bc}	13,3 ^{bc}
<i>B. alvei</i>	6,3 ^{ab}	5,9 ^a	12,8 ^{bc}

Perbedaan huruf pada superskrip menyatakan perbedaan nyata ($P < 0,05$) antar seluruh perlakuan

Sel khamir (Tabel 4) juga dapat tumbuh pada ketiga sumber karbon. Hasil analisis varians menunjukkan interaksi ($P < 0,05$). Khamir control *S. cerevisiae* paling baik pada ketiga substrat, sedangkan khamir hasil isolasi terbaik dari sumber yoghurt SP. 21 pada molases ($39,2 \times 10^{-1}$ mg/ml). Kecuali sel khamir yang diisolasi dari ayam umumnya biomassa yang terbentuk lebih besar daripada sel bakteri. Hasil ini berkaitan dengan ukuran sel yang lebih besar dan kecepatan pertumbuhan khamir yang umumnya hampir sama dengan bakteri. Sel khamir yang diisolasi dari ayam (*T. delbrueckii* AL-15 dan AL-16) tidak menunjukkan berat biomassa yang tinggi. Walaupun demikian produksi sel khamir ini harus dikembangkan lebih lanjut dengan substrat dan lingkungan mikro yang lebih sesuai. Penggunaan khamir ini sebagai probiotik unggas akan lebih sesuai, karena berasal dari lingkungan pencernaan unggas. Pada uji *in vivo* menggunakan ayam pedaging *B. apiarius* dan *T. delbrueckii* AL-15 mempunyai potensi sebagai probiotik menggantikan pemacu tumbuh

antibiotika. Di antara kedua mikroorganisme *B. apiarius* lebih baik daripada *T. delbrueckii* AL-15 (KOMPIANG et al., 2002).

Tabel 4. Produksi biomassa isolat khamir pada berbagai sumber karbon

No. Khamir	Biomassa ($\times 10^{-1}$ mg/ml) pada sumber karbon		
	Glukosa	Sukrosa	Molases
<i>T. delbrueckii</i> AL-15	8,3 ^{bc}	5,9 ^b	13,8 ^d
<i>T. delbrueckii</i> AL-16	2,6 ^{ab}	1,9 ^a	10,3 ^{cd}
Sp. 21	36,2 ^f	36,4 ^f	39,2 ^g
<i>S. kluyveri</i>	26,3 ^e	36,3 ^f	33,2 ^f
Sp. 25	9,8 ^c	13,7 ^{cd}	9,7 ^{bc}
<i>S. cerevisiae</i>	46,0 ^h	45,1 ^h	45,2 ^h

Perbedaan huruf pada superskrip menyatakan perbedaan nyata ($P < 0,05$) antar seluruh perlakuan

KESIMPULAN

Telah diperoleh 23 isolat bakteri dari kultur dagang campuran *Bacillus* spp, saluran pencernaan ayam lokal dan hibrid (ayam pedaging). Isolat bakteri bervariasi dengan bentuk batang dan kokus, berwarna Gram positif atau negatif. Pada saluran pencernaan ayam juga diperoleh 2 isolat khamir, sedangkan dari yoghurt diperoleh 5 isolat. Isolat bakteri dan khamir tersebut dapat tumbuh pada campuran larutan mineral dan glukosa, sukrosa, atau molases. Sukrosa merupakan substrat terbaik untuk kelompok bakteri sedangkan untuk ragi molases merupakan yang terbaik. Jenis bakteri yang memproduksi biomassa yang tinggi diperoleh pada kelompok basili yang terdiri dari *B. coagulans* pada sukrosa dan molases, *B. apiarius* pada sukrosa dan molases, dan *B. macroides* pada molases. Jenis khamir yang memperoleh biomassa tertinggi pada Sp. 21. *B. apiarius* baik untuk dikembangkan sebagai probiotik karena berasal dari saluran pencernaan ayam, sedangkan untuk khamir yang berasal dari saluran pencernaan ayam (*T. delbrueckii* AL-15 dan AL-16) perlu lebih lanjut dipelajari untuk proses optimasi produksi biomasanya.

DAFTAR PUSTAKA

- BARROW, P. A. 1992. Probiotics for Chickens. In: Probiotics the Scientific Basis. R. FULLER (Ed). Chapman & Hall, London. pp. 225-259.
- BUCHANAN, R. E. and E. GIBBONS. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. The Williams and Wilkins Co. Inc, Baltimore

- COWAN, S. T. 1975. Cowan and Steel's. Manual for identification of medical bacteria. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- FARDIAZ, S. 1989. Mikrobiologi Pangan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Bogor.
- HADDADIN, M. S. Y., S. M. ABDULRAHIM, E. A. R. HASLAMOUN, and R. K. ROBINSON. 1996. The effect of *Lactobacillus acidophilus* on the production and chemical composition on hen's eggs. *Poult. Sci.* 75: 491-494.
- HAVENAAR, R., B. T. BRINK, and J. H. J. HUIS IN 'T VELD. 1992. Selection of Strains for Probiotics Use. *In: Probiotics the Scientific Basis.* R. FULLER (Ed). Chapman & Hall, London. pp. 209-224.
- HAYAT, J., T. F. SAVAGE, and L. W. MIROSH. 1993. The reproductive performance of two genetically distinct lines of medium white turkey hens when fed breeder diets with and without a yeast culture containing *Saccharomyces cerevisiae*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 43: 291-301.
- JIN, L. Z., Y. W. HO, M. A. ALI, N. ABDULLAH, and S. JALALUDIN. 1996a. Effect of adherent *Lactobacillus* spp. on *in vitro* adherence of salmonellae to the intestinal epithelial cells of chickens. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 201-206.
- JIN, L. Z., Y. W. HO, M. A. ALI, N. ABDULLAH, and S. JALALUDIN. 1996b. Influence of dried *Bacillus subtilis* and lactobacilli cultures on intestinal microflora and performance in broilers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 9: 397-403.
- KOMPIANG, I. P. 2000. Pengaruh suplementasi kultur *Bacillus* spp. melalui pakan atau air minum terhadap kinerja ayam petelur. *JITV* 5: 205-209.
- KOMPIANG, I. P. 2002. Pengaruh ragi: *Saccharomyces cerevisiae* dan ragi laut sebagai pakan imbuhan probiotik terhadap kinerja unggas. *JITV* 7: 18-21.
- KOMPIANG, I. P., D. ZAENUDDIN, dan SUPRIYATI. 2002. Pengaruh suplementasi *Bacillus apiarius* atau *Torulaspora delbrueckii* terhadap penampilan ayam pedaging. *JITV* 7: 139-143.
- KRAGER-VAN RIJ, N. J. W. 1984. The Yeast. A Taxonomy Study. 3rd ed. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam.
- MARTIN, R. G. 1995. Using yeast culture and lactic acid bacteria in broiler breeder diets. *In: Biotechnology in the feed industry.* TP. LYONS & KA JACQUES (Eds). Proc. Alltech's Eleventh Annual Symp. pp. 371-378.
- STANIER, R. Y., E. A. ADELBERG, and J. INGRAHAM. 1976. The Microbial World. 4th ed. Prentice -Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
- STEEL, R.G.D. and J.H. TORRIE. 1980. Principles and Procedures of Statistics. 2nd ed. McGraw Hill, New York.
- THAYER, R. H., R. F. BURKITT, R. D. MORRISON, and E. E. MURRAY. 1978. Efficiency of utilization of dietary phosphorus by caged turkey breeder hens when fed rations supplemented with live yeast culture. Animal Science Research Report. Agricultural Experiment Station Oklahoma State University and USDA.

