

## Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik untuk Mengatasi Salmonellosis pada Ayam Pedaging (Characterization of Lactic Acid Bacteria as Probiotic Candidate to Overcome the Salmonellosis in Broiler)

Siti Chotiah\* dan Rini Damayanti

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Kotak Pos 151, Bogor 16124, Jawa Barat, Indonesia  
Telp. (0251) 8331048, 8334456, Faks. (0251) 8336425  
\*E-mail: sitichoti@yahoo.co.id, agusrini@indo.net.id

Diajukan: 5 Juli 2018; Direvisi: 26 November 2018; Diterima: 30 November 2018

### ABSTRACT

Food from livestock is needed by humans as a source of protein because it contains essential amino acids. However, these foods can endanger human health if they contain antibiotic residues in livestock products that can cause resistance to germs in the human body when consuming them. Along with the enactment of a policy to limit the use of antibiotics in animal feed, the use of probiotics as a substitute is urgently needed. This research has been conducted in the Research Center for Veterinary Science in order to produce probiotic candidates to control the growth of *Salmonella* sp in chickens that have the potential to pollute the environment and cause foodborne disease. Research on probiotics in chicken has conducted in Indonesian Research Center for Veterinary Science in order to produce probiotic candidates to control the growth of *Salmonella* sp. in chicken that potentially contaminated the environment causing foodborne disease. The present study aims to evaluate the probiotic potential of indigenous bacteria isolated from cattle in Bogor and select candidates to be used as probiotic. The study was initiated by screening local isolates for probiotic, following by inhibition test against a target of pathogenic bacteria (*Salmonella enterica* serotype of Typhimurium B0046/ATCC 13311 and serotype of Enteritidis B2893/ATCC 13076), pathogenicity *in vitro*, survival in the chicken gut, and the lifespan in the lyophilized container. The results showed that six isolates bacteria consisting of *Aerococcus viridans* B2776, *Bifidobacterium dentium* B2754 and B2755, *Enterococcus faecium* B2758, *Lactobacillus casei* B2752, and *Streptococcus uberis* B2757 had been selected as the candidate for probiotics. They had specifications namely: anti-microbial substance (*in vitro*) against *S. enterica* serotype Typhimurium BCC B0046 and serotype Enteritidis BCC B2893, not pathogenic, able to form colonies in intestinal broilers for 40 days with concentrations of  $>10^{10}$  CFU/gram with lifespan up to one year (lyophilized), using protectant serum of inositol 5% or 7,5% skim milk at 5°C with concentrations  $>\log_{10}$  CFU/ml. The potential characteristics qualified them as probiotics against pathogenic bacteria and could be used to control salmonellosis in the broiler.

**Keywords:** Probiotic, salmonellosis, foodborne disease, broiler.

### ABSTRAK

Pangan asal ternak sangat dibutuhkan manusia sebagai sumber protein karena mengandung asam-asam amino esensial, namun berbahaya untuk dikonsumsi jika mengandung residu antibiotik pada produk ternak yang dapat mengakibatkan resistensi terhadap kuman pada tubuh manusia. Sejak diberlakukan kebijakan untuk membatasi pemakaian antibiotik pada pakan ternak maka penggunaan probiotik banyak dipakai sebagai substitusinya. Penelitian ini dilakukan di BBLitvet untuk menghasilkan kandidat probiotik untuk mengontrol pertumbuhan bakteri *Salmonella* sp pada ayam yang potensial mencemari lingkungan dan sebagai penyebab *foodborne disease*. Metode yang dipakai pada penelitian ini meliputi penapisan isolat lokal bakteri kandidat probiotik, uji daya hambat terhadap bakteri patogen target (*Salmonella enterica*) serotipe Typhimurium B0046 (NCTC 74, ATCC 13311) dan serotipe Enteritidis B2893 (ATCC 13076), patogenesis *in vitro*, daya tahan hidup dalam usus ayam, dan masa simpan dalam kemasan liofilisasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enam isolat bakteri yang terdiri dari *Aerococcus viridans* B2776, *Bifidobacterium dentium* B2754 dan B2755, *Enterococcus faecium* B2758, *Lactobacillus casei* B2752, dan *Streptococcus uberis* B2757 telah terseleksi sebagai kandidat probiotik. Keenam isolat tersebut mempunyai sifat-sifat: antimikroba (*in vitro*) terhadap *Salmonella enterica* serotipe Typhimurium BCC B0046 dan serotipe Enteritidis BCC B2893, tidak patogen, mampu membentuk koloni dalam usus ayam pedaging selama 40 hari dengan konsentrasi  $>10^{10}$  CFU/gram, dan masa simpan sampai 1 tahun dalam bentuk liofilisasi menggunakan protektan inositol serum 5% atau susu skim 7,5% pada suhu simpan 5°C dengan konsentrasi  $>\log_{10}$  CFU/ml. Karakteristik potensial tersebut telah memenuhi syarat sebagai probiotik terhadap bakteri patogen dan dapat digunakan untuk mengendalikan salmonellosis pada ayam pedaging.

**Kata kunci:** Probiotik, salmonellosis, *foodborne disease*, ayam pedaging.

## PENDAHULUAN

Usaha peternakan ayam merupakan salah satu kegiatan ekonomi yang penting di Indonesia, selain untuk meningkatkan produksi protein hewani juga dapat menambah lapangan pekerjaan. Salah satu masalah dalam usaha ini adalah gangguan penyakit, di antaranya adalah salmonellosis. Salmonellosis merupakan *foodborne pathogens* paling penting, karena tingginya jumlah kasus infeksi dan kematian pada manusia (Quinlan 2013). Salmonellosis pada anak ayam disebabkan oleh bakteri *Salmonella enterica* terutama serotipe Enteritidis dan Typhimurium penyebab *foodborne disease* yang bersifat zoonosis (Russell 2012). *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotipe Enteritidis merupakan serovar paling banyak dalam wabah *foodborne disease* yang terjadi di Brazil (Vaz et al. 2010).

Pemberian antibiotik pada ayam yang tidak sesuai prosedur akan mengakibatkan resistensi dan pengaruh negatif pada manusia sebagai konsumen (Mackie 2011). Selain itu, pemberian antibiotik juga dapat mengganggu keseimbangan mikroba di dalam saluran pencernaan baik manusia maupun hewan (Gilang et al. 2013). *Salmonella enteritidis* yang diisolasi dari telur dan manusia memiliki resistensi tinggi masing-masing 85,9 dan 85,7% terhadap antibiotik golongan aminoglikosida (Kusumaningsih dan Sudarwanto 2011), sedangkan yang diisolasi dari ayam sakit dan mati dalam kasus salmonellosis 70% resisten terhadap ampisilin (Chotiah dan Damayanti 2014). Kebijakan tentang pembatasan penggunaan antibiotik dalam pakan ternak telah diterapkan di beberapa negara, seperti Denmark tahun 1995, Jerman tahun 1996, dan Swiss tahun 1999 (Cogliani et al. 2011). Kebijakan tersebut harus diimbangi dengan tersedianya antimikroba alternatif untuk mencapai tujuan akhir dengan tepat.

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri anaerob fakultatif yang mampu hidup pada habitat yang cukup luas, seperti saluran pencernaan hewan dan manusia, makanan kalengan, produk susu, produk fermentasi, buah-buahan, dan sayur-sayuran tropis. BAL telah digunakan sebagai pengawet makanan, kultur fermentasi, dan pangan

probiotik karena mempunyai aktivitas antimikroba dan pembusuk makanan (Rahmiati dan Mumpuni 2017). Sunaryanto et al. (2014) mengisolasi bakteri *Lactobacillus casei* dari susu fermentasi yang berperan sebagai probiotik. Isolat ini mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Enterococcus faecalis*. Peranan terpenting BAL adalah memproduksi komponen antimikroba, seperti bakteriosin.

Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dapat berupa protein yang memberikan efek bakterisidal yang merupakan biopreservatif pada bahan makanan dan memperpanjang umur simpan produk. Beberapa probiotik yang merupakan flora normal pada saluran pencernaan telah berhasil diisolasi antara lain bakteri asam laktat (BAL), seperti dilaporkan oleh Nelintong et al. (2015).

Probiotik merupakan salah satu alternatif pengganti antibiotik (Taheri et al. 2009). Probiotik didefinisikan sebagai mikroba hidup yang memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan induk semangnya (FAO 2002). Kriteria mikroorganisme probiotik yang telah ditetapkan oleh FAO (2002) antara lain harus teridentifikasi fenotipe dan genotipe, mampu bertahan hidup pada kondisi asam lambung dan garam empedu pencernaan, memberi keuntungan pada usus, mampu menempel pada mukus dan atau sel epitel usus, menghasilkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen, merupakan mikroorganisme yang aman atau termasuk mikroorganisme GRAS (*generally recognized as safe*), tidak menghasilkan toksin, tidak bersifat resisten terhadap antibiotik, dan bukan bakteri patogen (EFSA 2012).

Pemanfaatan probiotik pada ternak di samping untuk stimulasi produktivitas juga sebagai strategi prapanen dalam keamanan pangan yang dianggap penting untuk mengontrol kolonisasi bakteri patogen pada ternak (Gillor et al. 2004). Strategi ini untuk mengurangi atau mencegah terjadinya kontaminasi bakteri patogen penyebab *foodborne disease* terutama *typhus* sudah dimulai sejak dari hulu/proses produksi unggas yaitu telur dan daging. Penelitian bakteriosin di Indonesia telah dilakukan dengan aplikasi sebagai pengawet alami makanan (Harmayani et al. 2009; Usmiati et

al. 2009; Arief et al. 2012) dan kontrol biologis terhadap patogen pada ikan lele (Nurhajati et al. 2012).

BBLitvet *Culture Collection* (BCC) memiliki koleksi mikroba bakteri potensial yang dapat menghasilkan antibakteri, namun pemanfaatannya pada ternak belum diteliti. Koleksi tersebut secara *in vitro* memiliki daya hambat terhadap bakteri patogen tertentu dalam saluran pencernaan (Chotiah 2013). Dalam rangka untuk memanfaatkan bakteri isolat lokal yang potensial menghasilkan zat antibakteri terhadap patogen tertentu pada ternak, penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengevaluasi isolat bakteri indigen asal sapi di Bogor sebagai upaya mencari alternatif pengganti probiotik untuk mengatasi salmonellosis pada ayam pedaging.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Balai Besar Penelitian Veteriner pada tahun anggaran 2015 dan 2016 dengan dana APBN. Terdapat lima tahap penelitian, yaitu penyiapan isolat dari koleksi BCC, pengujian aktivitas antibakteri isolat kandidat probiotik terhadap patogen uji, uji patogenitas bakteri kandidat probiotik *in vitro*, penentuan daya tahan bakteri kandidat probiotik di dalam usus halus ayam, dan penentuan masa simpan bakteri kandidat probiotik.

### Isolat Bakteri yang Dipakai

Sebanyak 9 isolat bakteri digunakan dalam penelitian ini, yaitu *Aerococcus viridans* (B2776, B2778 dan B2786), *Bifidobacterium dentium* (B2754 dan B2755), *Enterococcus faecium* (B2758), *Enterococcus duran* (B2765), *Lactobacillus casei* (B2752), dan *Streptococcus uberis* (B2757) yang merupakan koleksi BBLitvet *Culture Collection* (BCC). Masing-masing isolat dalam kemasan ampul kering beku dibuka, disuspensikan ke dalam medium kaldu *de man Rogosa Sharpe* (MRS) dan diinkubasikan pada suhu 37°C dalam kondisi aerob selama satu malam. Selanjutnya, kultur dibiakkan di dalam medium padat MRS dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam

kondisi anaerob selama 24 jam. Bakteri patogen yang digunakan dalam ujiantang yaitu *Salmonella enterica* serotipe Typhimurium B0046/ATCC 13311) dan serotipe Enteritidis B2893/ATCC 13076). Bakteri tersebut ditumbuhkan dalam medium padat yang berisikan darah domba 5%. Hasil panen kultur murni dari bakteri kandidat probiotik maupun bakteriantang masing-masing disuspensikan dalam medium susu skim 10% yang ditambahkan 30% gliserol. Selanjutnya, masing-masing suspensi tersebut didistribusikan ke dalam tabung-tabung kecil bervolume 1 ml dan disimpan pada suhu -20°C untuk keperluan berikutnya.

### Pengujian Aktivitas Antibakteri Isolat Kandidat Probiotik terhadap Patogen Uji

Metode yang digunakan untuk pengujian aktivitas adalah *agar spot tests* menurut Emanuel et al. (2005) yang dimodifikasi. Masing-masing bakteri murni yang diuji ditumbuhkan dalam 3 ml medium kaldu MRS, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam dalam *shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Kultur murni disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 ×g pada suhu 4°C selama 5 menit. Filtrat dipisahkan dan disaring menggunakan filter 0,45 µm, kemudian disimpan pada suhu 5°C untuk digunakan lebih lanjut. Masing-masing bakteri patogen ditumbuhkan dalam medium kaldu *brain heart infusion* (BHI), diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 malam, tidak digoyang dalam *shaker* karena pertumbuhan bakterinya sangat subur.

Sebanyak 0,5 ml suspensi biakan tersebut pada konsentrasi McFarland nomor 0,5 (ekuivalen dengan  $1,5 \times 10^8$  colony forming unit (CFU)/ml) dicampurkan ke dalam 5 ml BHI agar lunak (47°C), kemudian dituangkan di atas cawan petri yang berisikan medium BHI agar yang sudah memadat dan didiamkan pada suhu kamar sampai agar lunak memadat. Sebanyak 10 µl filtrat yang diuji diteteskan di atas medium agar lunak tersebut dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam. Zona jernih yang terbentuk di sekitar tetesan diamati dan diukur diameternya. Masing-masing isolat yang diuji terhadap bakteri patogen dilakukan pengulangan *duplo*.

### Uji Patogenitas Bakteri Kandidat Probiotik Secara *In Vitro*

Sebelum dilakukan uji tantang dengan bakteri patogen maka dipilih bakteri kandidat probiotik yang paling potensial dan tidak bersifat patogen (Widanari et al. 2010). Terhadap bakteri kandidat probiotik yang digunakan pada penelitian ini sebelumnya dilakukan pengujian patogenitas yang meliputi uji *congo red* dan uji hemolisis darah

#### Uji Hemolisis

Pengujian dilakukan sesuai prosedur dari Berkhoff dan Vinal (1986). Masing-masing bakteri kandidat probiotik ditumbuhkan pada medium padat darah domba 5%, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang memperlihatkan zona bening ( $\alpha$  hemolisis) menunjukkan adanya hemolisin positif.

#### Uji *Congo Red*

Pengujian dilakukan sesuai prosedur dari (Panigarhy and Yushen 1990). Masing-masing bakteri kandidat probiotik ditumbuhkan pada medium *Congo Red Trypticase Soy Agar* (CRTSA) yang terdiri atas TSA + 0,003% *Congo Red dye* (Sigma) + 0,15% *bile salts* (OXOID), dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, kultur disimpan dalam suhu kamar selama 48 jam. Isolat yang bersifat invasif ditunjukkan dengan kemampuan koloni dalam menyerap zat pewarna *congo red*. Warna merah menunjukkan isolat positif dan tidak berwarna isolat negatif.

#### Penentuan Daya Tahan Bakteri Kandidat Probiotik Di Dalam Usus Halus Ayam

Pada penelitian penentuan daya tahan bakteri kandidat probiotik di dalam usus halus ayam dilakukan menurut Jannah et al. (2014). Pada penelitian ini dipakai 100 ekor ayam pedaging (DOC, *day-old-chick*) jantan dan betina yang terdiri dari kelompok kontrol yang diberi cairan fisiologis dan kelompok yang diberi kandidat probiotik. Ayam dipelihara dalam kandang berukuran 25 m<sup>2</sup> yang disekat, diberi pakan komersial tanpa antibiotik dan minum secukupnya dengan penerangan cukup.

Semua ayam divaksin terhadap *Newcastle Disease* (ND), *Infectious Bursal Disease* (IBD), *Infectious Bronchitis* (IB), dan Avian Influenza (AI) sesuai prosedur.

Ayam umur 3 hari pada kelompok perlakuan diberi kultur campuran bakteri kandidat probiotik dosis >10<sup>10</sup> CFU/ekor dan kelompok kontrol diberikan larutan salin fisiologis dengan pemberian per oral (“dicekok”). Pada hari ke-10, 20, 30, 40 pasca pemberian perlakuan, ayam diautopsi dan diambil potongan usus halus (masing-masing kelompok 10 ekor). Peubah yang diamati adalah populasi bakteri kandidat probiotik dalam usus halus ayam kelompok kontrol maupun perlakuan. Di samping itu, juga dilakukan pengamatan patologi anatomi dan histopatologi untuk mengetahui ada atau tidaknya lesi.

#### Penentuan Masa Simpan Bakteri Kandidat Probiotik

Masing-masing isolat bakteri kandidat probiotik dari medium stok ditumbuhkan di dalam medium MRS agar, diinkubasi pada suhu 37°C secara semi anaerob selama 24 jam. Hasil panen koloni murni disuspensikan dengan medium protektan. Medium protektan yang dipakai ada dua jenis, inositol serum 5%, dan *skim milk* 7,5% (perbandingan koloni murni dan masing masing medium protektan 1:1, @ 0.5 ml). Sebanyak 1 ml dari masing-masing suspensi tersebut diisikan ke dalam vial ukuran 10 ml, kemudian dilakukan pengeringbekuan dengan alat *freeze drier*. Dalam waktu yang bersamaan suspensi diencerkan kelipatan 10 dari mulai 10<sup>-1</sup> sampai dengan 10<sup>-10</sup>. Sebanyak 50 µl dari masing-masing pengenceran 10<sup>-7</sup> sampai dengan 10<sup>-10</sup> dituangkan ke dalam medium padat MRS, diinkubasi pada suhu 37°C dalam kondisi anaerob selama 24 jam. Setiap perlakuan dilakukan tiga kali ulangan. Selanjutnya, jumlah koloni bakteri kandidat probiotik yang tumbuh dihitung dalam satuan CFU/ml. Bakteri kandidat probiotik yang telah dikeringbekuan diambil sebanyak 3 vial (untuk masing-masing medium protektan) dan dihitung viabilitasnya dalam satuan CFU/ml. Vial-vial lainnya dibagi menjadi 2 dan disimpan pada dua level suhu yaitu 4°C (suhu

lemari es) dan 27°C (suhu kamar tanpa AC) dengan lama penyimpanan yaitu 1, 2, 6, dan 12 bulan. Peubah yang diamati adalah viabilitas bakteri kandidat probiotik pada masing-masing kombinasi perlakuan menggunakan metode *Total Plate Count* yang dilanjutkan dengan identifikasi dari masing-masing isolat kandidat probiotik menggunakan API 50 CHL (BIOMERIEUX, Perancis).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Antibakteri pada Bakteri Kandidat Probiotik

Hasil pengujian antibakteri bakteri kandidat probiotik terhadap *S. enteritidis* BCC B2839/ATCC 13076 menunjukkan bahwa *A. viridans* B2776, *B. dentium* B2754, *B. dentium* B2755, *E. faecium* B2758, dan *S. uberis* B2757 mampu menunjukkan zona penghambatan. Sementara itu, hasil pengujian antibakteri terhadap *S. typhimurium* BCC B0046/ATCC 13311 menunjukkan bahwa *A. viridans* B2778, *B. dentium* B2754, *B. dentium* B2755, *L. casei* B2752, dan *S. uberis* B2757 mampu membentuk zona hambat. Lebar zona hambat masing-masing isolat bakteri kandidat probiotik terhadap *S. typhimurium* BCC B0046/ATCC 13311 dan *S. enteritidis* BCC B2839/ATCC 13076 ditunjukkan pada Tabel 1. Berdasarkan hasil uji ini, telah diseleksi 7 isolat dari 15 isolat bakteri yang diuji. Nelintong et al. (2015) dalam studinya menyebutkan bahwa zona hambat tertinggi yang dihasilkan oleh *L. plantarum* dan *L. casei* susu

fermentasi pada rasio 9 : 1 adalah  $12,43 \pm 0,29$  mm terhadap *S. typhimurium* sedangkan pada penelitian ini zona hambat tertinggi dihasilkan oleh *Lactobacillus casei* B2752 terhadap *S. typhimurium* BCC B0046/ATCC 13311 dan *Eterococcus faecium* B2758 terhadap *S. enteritidis*.

### Patogenitas *In Vitro* Bakteri Kandidat Probiotik

Hasil uji patogenisitas bakteri kandidat probiotik secara *in vitro* dapat dilihat dalam Tabel 2 yang menunjukkan bahwa 1 isolat (*A. viridans* B2778) dari 7 isolat bakteri terpilih bersifat patogen. Isolat *A. viridans* B2778 mampu memproduksi hemolisin yang ditandai dengan terbentuknya  $\alpha$  hemolitik dalam 5% agar darah domba (Munoz-Planillo et al. 2009). Dengan demikian, pengujian lebih lanjut dilakukan terhadap 6 isolat bakteri kandidat probiotik terseleksi yang tidak bersifat patogen, yaitu *A. viridans* B2776, *B. dentium* B2754, *B. dentium* B2755, *E. faecium* B2758, *L. casei* B2752, dan *S. uberis* B2757. Uji patogenitas tersebut juga dilakukan oleh Widanari et al. (2010) untuk mengetahui bakteri kandidat probiotik yang paling potensial tetapi tidak bersifat patogen yang kemudian akan diuji efektifitasnya dalam menghambat bakteri patogen. Penapisan terhadap bakteri asam laktat sebagai kandidat probiotik pada ayam juga dilaporkan oleh Taheri et al. (2009) yang menyebutkan bahwa kandidat yang terpilih adalah yang memiliki sifat-sifat: hidrofobik permukaan sel tinggi, koagregasi, dan ketahanan terhadap garam empedu serta kondisi asam.

**Tabel 1.** Zona hambat yang dibentuk oleh antibakteri dari bakteri kandidat probiotik terhadap *S. typhimurium* BCC B0046/ATCC 13311 dan *S. enteritidis* BCC B2839/ATCC 13076.

Spesies bakteri kandidat probiotik	Zona hambat (mm)	
	<i>S. typhimurium</i> BCC B0046	<i>S. enteritidis</i> BCC B2893
<i>Aerococcus viridans</i> B2776	0	10
<i>Aerococcus viridans</i> B2778	10	0
<i>Aerococcus viridans</i> B2786	0	0
<i>Bifidobacterium dentium</i> B2754	15	10
<i>Bifidobacterium dentatum</i> B2755	10	9
<i>Eterococcus duran</i> B2765	0	0
<i>Eterococcus faecium</i> B2758	0	12
<i>Lactobacillus casei</i> B2752	25	0
<i>Streptococcus uberis</i> B2757	11	11

BCC = BBLitvet Culture Collection.

### Daya Tahan Bakteri Kandidat Probiotik Di Dalam Usus Halus Ayam

Enam isolat bakteri kandidat probiotik tahan terhadap pengaruh enzim dan pH yang ada di dalam saluran pencernaan ayam. Hal ini dibuktikan dengan adanya kolonisasi dalam usus ayam dengan konsentrasi  $10^4$  CFU/gram yang masih terpantau sampai dengan 40 hari pasca pemberian (Gambar 1). Jika dibanding dengan kelompok kontrol, walaupun ditemukan konsentrasi tinggi tetapi hasil identifikasi merupakan bakteri lain yang berbeda dari kandidat probiotik. Pada umumnya ayam pedaging akan dipanen pada umur sekitar 1 bulan, sehingga diasumsikan dengan pemberian kultur kandidat probiotik pada ayam pedaging cukup dengan satu kali pemberian diharapkan mampu mengontrol patogen *Salmonella* spp.

Gambaran patologi anatomi dan histopatologi pada usus ayam percobaan maupun ayam kontrol pada pengamatan 10, 20, 30, dan 40 hari pasca pemberian enam isolat bakteri kandidat probiotik, tidak ada kelainan yang spesifik. Hal ini menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut tidak

patogen baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Menurut Chambers dan Gong (2011), probiotik memiliki fungsi utama bagi inang dalam meningkatkan populasi mikroflora usus yang menguntungkan, meningkatkan kesehatan usus, dan menurunkan/mencegah kolonisasi bakteri patogen usus.

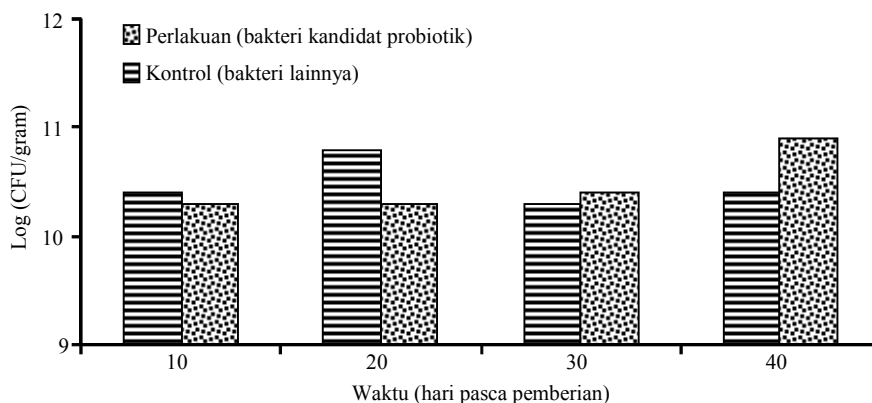
### Masa Simpan Bakteri Kandidat Probiotik

Di dalam menetapkan masa kadaluwarsa penggunaan bakteri kandidat probiotik telah dilakukan penyimpanan selama 12 bulan. Bakteri kandidat probiotik tersebut dalam kemasan bentuk liofilisasi yang ditambahkan susu skim maupun inositol serum, viabilitasnya masih menunjukkan  $>\log_{10}$  setelah masa simpan 12 bulan pada suhu refrigerator  $5^{\circ}\text{C}$  (Gambar 2). Hasil ini menunjukkan bahwa kandidat probiotik ini dalam kemasan liofilisasi menggunakan protektan inositol serum 5% atau susu skim 7,5% pada suhu simpan  $5^{\circ}\text{C}$  belum kadaluwarsa untuk digunakan sebagai dosis pada ayam karena konsentrasinya menunjukkan  $\geq 10^{10}$  CFU/ml.

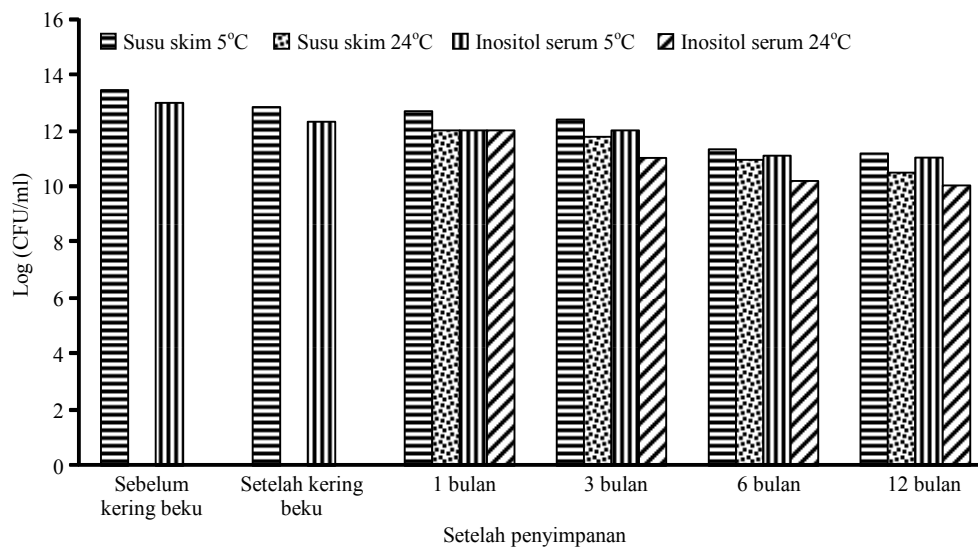
**Tabel 2.** Hasil uji patogenisitas secara *in vitro* terhadap 7 spesies bakteri kandidat probiotik.

Spesies bakteri kandidat probiotik	Patogenisitas <i>in vitro</i>	
	$\alpha$ hemolitik dalam agar darah domba 5%	Invasif dalam medium CRTSA
<i>Aerococcus viridans</i> B2778	Positif	Negatif
<i>Aerococcus viridans</i> B2776	Negatif	Negatif
<i>Bifidobacterium dentium</i> B2754	Negatif	Negatif
<i>Bifidobacterium dentatum</i> B2755	Negatif	Negatif
<i>Eterococcus faecium</i> B2758	Negatif	Negatif
<i>Lactobacillus casei</i> B2752	Negatif	Negatif
<i>Streptococcus uberis</i> B2757	Negatif	Negatif

CRTSA = Congo Red Trypticase Soy Agar.



**Gambar 1.** Daya tahan bakteri kandidat probiotik dalam usus halus ayam pedaging.



Gambar 2. Viabilitas bakteri kandidat probiotik setelah penyimpanan sampai dengan 12 bulan.

Bahan pengawet alami dapat digunakan sebagai senyawa antimikroba, salah satunya adalah bakteriosin yang diproduksi oleh asam laktat. Bakteri asam laktat dapat bertahan hidup pada medium yang sesuai atau medium yang memiliki komposisi nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhannya. Bakteri akan mampu mempertahankan diri dengan baik di dalam lingkungan selama kondisinya menguntungkan (Sutrisna et al. 2017). Penelitian serupa untuk mempertahankan jumlah populasi isolat BAL dapat dilakukan dengan penambahan molase 1,6% dalam ransum (R2) pada jam ke-4 dengan jumlah sel  $7,36 \times 10^5$  CFU/g sebagai dosis penggunaan pada ayam (Sutrisna et al. 2017).

## KESIMPULAN

Enam isolat lokal bakteri kelompok Gram positif kandidat probiotik yang terdiri dari *Aerococcus viridans* B2776, *Bifidobacterium dentium* B2754 dan B2755, *Enterococcus faecium* B2758, *Lactobacillus casei* B2752, dan *Streptococcus uberis* B2757 ditentukan sebagai kandidat probiotik untuk ayam. Kandidat probiotik tersebut bersifat tidak patogen, memiliki aktivitas antimikroba (*in vitro*) terhadap *Salmonella enterica* serotipe Typhimurium BCC B0046 dan serotipe Enteritidis BCC B2893, tahan berkolonisasi dalam usus ayam pedaging selama 40 hari dengan kon-

sentrisi  $>10^{10}$  CFU/gram, dan masa simpan sampai 1 tahun dalam bentuk liofilisasi menggunakan protektan inositol serum 5% atau susu skim 7,5% pada suhu simpan 5°C dengan konsentrasi  $>\log 10$  CFU/ml.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arief, I.I., Jenie, B.S.L., Suryati, T., Ayuningtyas, G. & Fuziawan, A. (2012) *Lactobacillus plantarum* 2C12 and its application on beef meatballs as biopreservative. *Journal of Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 37 (2), 90–96.
- Berkhoff, H. & Vinal, A. (1986) Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive *Escherichia coli* pathogenic for poultry. *Avian Diseases*, 30 (1), 117–121.
- Chambers, J.R. & Gong, J. (2011) The intestinal microbiota and its modulation for Salmonella control in chickens. *Food Research International*, 44, 3149–3159. doi:10.1016/J.FOODRES.2011.08.017.
- Chotiah, S. (2013) Eksplorasi dan konservasi sumber daya genetik mikroba penghasil bakteriosin penghambat pertumbuhan bakteri patogen pada ternak. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 18 (2), 114–122.
- Chotiah, S. & Damayanti, R. (2014) Infeksi *Salmonella enteritidis* pada ayam pedaging dan pola resistensi terhadap antibiotik. Dalam: Pamungkas, D, Widiawati, Y, Noor, SM, Purwantari, ND, Widiastuti, R, Brahmanyio, B, Herawati, T, Kusumaningsih, A, Handiwirawan, E, Puastuti, W.I. (editor) *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Malang, IAARD Press, hlm. 612–618.

- Cogliani, C., Goossens, H. & Greko, C. (2011) Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. *Microbe*, 6 (6), 274–279. doi:10.1128/microbe.6.274.1.
- Emanuel, V., Adrian, V., Ovidiu, P. & Gheorghe, C. (2005) Isolation of a *Lactobacillus plantarum* strain used for obtaining a product for the preservation of fodders. *African Journal of Biotechnology*, 4, 403–408.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2012) Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10 (6), 1–10. doi:10.2903/j.efsa-2012.2740.
- Food and Agriculture Organization of United Nations & Organization (FAO) (2002) *Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, London Ontario.
- Gilang, I.G., Raditya, I., Bagus, I., Ardana, K. & Suastika, P. (2013) Tebal struktur histologis duodenum ayam pedaging yang diberi kombinasi tylosin dan gentamicin. *Indonesia Medicus Veterinus*, 2 (5), 546–552.
- Gillor, O., Kirkup, B.C. & Riley, M.A. (2004) Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Advances in Applied Microbiology*, 129–146. doi:10.1016/S0065-2164(04)54005-4.
- Harmayani, E., Rahayu, E., Djaafar, T., Sari, C. & Marwati, T. (2009) Pemanfaatan kultur *Pediococcus acidilactici* F-11 penghasil bakteriosin sebagai penggumpal pada pembuatan tahu. *Jurnal Pascapanen*, 6 (1), 10–20.
- Jannah, S.N., Dinoto, A., Wiryawan, K.G. & Rusmana, I. (2014) Characteristics of lactic acid bacteria isolated from gastrointestinal tract of Cemani chicken and their potential use as probiotics. *Media Peternakan*, 37 (3), 182–189. doi:10.5398/medpet.2014.37.3.182.
- Kusumaningsih, A. & Sudarwanto, M. (2011) Infeksi *Salmonella enteritidis* pada telur ayam dan manusia serta resistensinya terhadap antimikroba. *Berita Biologi*, 10 (6), 771–780.
- Mackie, B. (2011) Lessons from Europe on reducing antibiotic use in livestock. *B.C. Medical Journal*, 3, 487. doi:10.1002/9781444395150.ch4.
- Munoz-Planillo, R., Franchi, L., Miller, L.S. & Nunez, G. (2009) A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus*-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *The Journal of Immunology*, 183 (6), 3942–3948. doi:10.4049/jimmunol.0900729.
- Nelintong, N., Isnaeni & Nasution, N. (2015) Aktivitas antibakteri susu probiotik *Lactobacilli* terhadap bakteri penyebab diare (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*). *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 2 (1), 25–30.
- Nurhajati, J., Atira, Aryantha, I.N.P. & Kadek Indah, D.G. (2012) The curative action of *Lactobacillus plantarum* FNCC 226 to to *Saprolegnia parasitica* A3 on catfish (*Pangasius hypophthalmus sauvage*). *International Food Research Journal*, 19 (4), 1723–1727.
- Panigarhy, B. & Yushen, L. (1990) Differentiation of pathogenic and non pathogenic *Escherichia coli* isolated from poultry. *Avian Disease*, 34, 941–943.
- Quinlan, J.J. (2013) Foodborne illness incidence rates and food safety risks for populations of low socioeconomic status and minority race/ethnicity: A review of the literature. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 10 (8), 3634–3652. doi:10.3390/ijerph10083634.
- Rahmiati & Mumpuni, M. (2017) Eksplorasi bakteri asam laktat kandidat probiotik dan potensinya dalam menghambat bakteri patogen. *Elkwanie*, 3 (2), 141–150.
- Russell, S.M. (2012) *Controlling salmonella in poultry production and processing*. 1 st. Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Sunaryanto, R., Martius, E. & Marwoto, B. (2014) Uji kemampuan *Lactobacillus casei* sebagai agensia probiotik. *Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 1 (1), 9–14.
- Sutrisna, R., Ekowati, C., Farisi, S. & Setyawan, H. (2017) The viability test of lactic acid bacteria from intestine in preparation on poultry ration. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 5 (3), 53–57.
- Taheri, H.R., Moravej, H., Tabandeh, F., Zaghari, M. & Shivazad, M. (2009) Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. *Poultry Science*, 88 (8), 1586–1593. doi:10.3382/ps.2009-00041.
- Usmiati, S., Miskiyah & Maheswari, R.R.A. (2009) Pengaruh penggunaan bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. galur SCG 1223 terhadap kualitas mikrobiologi daging sapi segar. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 14 (2), 150–166.
- Vaz, C., Streck, A., Michael, G., Marks, F., Rodrigues, D., dos Reis, E., Cardoso, M. & Canal, C. (2010) Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies enterica Serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. *Poultry Science*, 89, 1530–1536. doi:10.3382/ps.2009-00453.
- Widanari, Rajab, F., Sukenda & Setiawati, M. (2010) Isolasi dan seleksi tambak dan hatcheri untuk pengendalian penyakit vibriosis pada larva udang windu, *Penaeus monodon*. *Jurnal Risalah Akuakultur*, 5 (1), 103–113.