

Daya Hambat Granul Ekstrak Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) Terhadap Bakteri Patogenik *In Vitro*

Inhibitory Effect of Extract Granule of Earthworms (*Lumbricus rubellus*) on the Pathogenic Bacteria *In Vitro*

Lusty Istiqomah¹, Ema Damayanti¹, Hardi Julendra¹, Dewi Istika², dan Sri Winarsih²

¹Balai Pengembangan Proses dan Teknologi Kimia (BPPTK)-LIPI, Yogyakarta

²Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Sebelas Maret, Surakarta

Email: lust001@lipi.go.id / ps_uty@yahoo.com

Abstract

The objective of this study was to determine the inhibition ability of the earthworm (*L. rubellus*) extract (ECT), dried earthworm extract (ECT-k), and granule earthworm extract (ECT-g) as poultry feed additive against some pathogenic bacteria. Antibacterial activity was performed using diffusion method against *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus in vitro*. In the present study, the concentrations of ECT, ECT-k, and ECT-g in nutrient broth (NB) media tested were consisted of treatments A: 0%, B: 0.26%, C: 0.52%, D: 0.78% and E: 1.04% (g/vol) respectively. The results of the *in vitro* study showed that started from ECT level 0.26% inhibited ($P < 0.05$) growth of *P. aeruginosa* and *S. aureus*, while ECT level 0.52% inhibited ($P < 0.05$) *E. coli* and *S. pullorum* which proportional to the increased in concentration. ECT-k level 0.26% inhibited ($P < 0.05$) growth of *E. coli* and *S. aureus*, while ECT-k level 0.52% inhibited ($P < 0.05$) *P. aeruginosa*, and ECT-k level 1.04% inhibited ($P < 0.05$) growth of *S. pullorum*. ECT-g level 0.26% inhibited ($P < 0.05$) growth of *S. pulorum*, while ECT-g level 0.52% inhibited ($P < 0.05$) *S. aureus* and ECT-g level 1.04% inhibited ($P < 0.05$) growth of *P. aeruginosa*. There were no antibacterial action ($P > 0.05$) of ECT and ECT-t against *S. pullorum*. Diameter of inhibition zone for 24 hours showed that *S. aureus* was the most sensitive bacterium to ECT and ECT-k, and *S. pullorum* was the most sensitive bacterium to ECT-g.

Key words: antibacterial activity, granulation, earthworm (*L. rubellus*), extract

Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari kemampuan penghambatan ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) (ECT), ekstrak kering cacing tanah (ECT-k), dan ekstrak cacing tanah tergranulasi (ECT-g) sebagai imbuhan pakan unggas terhadap beberapa bakteri patogen. Uji *in vitro* aktivitas antibakteri digunakan metode difusi terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. Konsentrasi ECT, ECT-k, dan ECT-g yang diuji pada penelitian ini terdiri atas perlakuan A: 0%, B: 0.26%, C: 0.52%, D: 0.78% and E: 1.04% (g/vol) pada media *nutrient broth* (NB). Hasil uji *in vitro* menunjukkan bahwa mulai dari tingkat ECT 0.26% mampu menghambat ($P < 0.05$) pertumbuhan *P. aeruginosa* dan *S. aureus*, sedangkan tingkat ECT 0.52% baru mulai menghambat ($P < 0.05$) *E. coli* and *S. pullorum* seiring dengan penambahan tingkat konsentrasi. Tingkat ECT-k 0.26% menghambat ($P < 0.05$) pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus*, sedangkan tingkat ECT-k 0.52% baru mulai menghambat ($P < 0.05$) *P. aeruginosa*, dan tingkat ECT-k 1.04% menghambat ($P < 0.05$) pertumbuhan *S. pullorum*. Tingkat ECT-g 0.26% mulai menghambat ($P < 0.05$) pertumbuhan *S. pullorum*, sedangkan tingkat ECT-g 0.52% menghambat ($P < 0.05$) *S. aureus* dan tingkat ECT-g 1.04% menghambat ($P < 0.05$) pertumbuhan *P. aeruginosa*. Tidak terdapat aktivitas antibakteri ($P > 0.05$) dari ECT-g terhadap *E. coli*. Diameter zona hambat selama 24 jam menunjukkan, bahwa *S. aureus* merupakan bakteri yang paling sensitif terhadap ECT and ECT-k, dan *S. pullorum* paling sensitif terhadap ECT-g.

Kata kunci: aktivitas antibakteri, granulasi, cacing tanah (*L. rubellus*), ekstrak

Pendahuluan

Penyakit unggas yang disebabkan oleh infeksi bakteri sangat beragam diantaranya *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus aureus*. Pada unggas serotipe *E. coli* tertentu dapat menyebabkan dermatitis nekrotika (selulitis) yakni radang pada jaringan subkutan, terutama pada otot dada bagian bawah (Mellata *et al.*, 2003) sehingga secara ekonomi infeksi *E. coli* pada unggas sangat merugikan peternak (Wooley *et al.*, 2000; Knobl *et al.*, 2006). Penyakit *pullorum* yang disebabkan oleh *S. pullorum* dapat menekan sistem kekebalan (imunopresi) unggas dan dapat menyebabkan kematian ayam pedaging sampai 80-100% (Shivaprasad, 2003; McMullin, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* menyebabkan penyakit terlokalisasi dan sistemik. Penyakit yang disebabkan *P. aeruginosa* ditandai dengan penempelan dan kolonisasi bakteri tersebut pada jaringan inang.

Pseudomonas aeruginosa juga dapat membentuk biofilm yang terbuat dari kapsul glikokalis untuk mengurangi keefektifan mekanisme sistem imun inang. Infeksi *S. aureus* yang dipicu oleh penyakit imunopresi dapat menyebabkan kematian mendadak karena terjadi septisemia. Pada kondisi ini biasanya bengkak atau radang sendi sebagai gejala jarang muncul. Lesi tersebut merupakan penyakit yang sering terjadi pada ayam. Penyakit ini menyebabkan ayam menjadi pincang sampai tidak dapat berjalan, dan jika berlanjut dapat terjadi kematian.

Pemberian antibiotik untuk mengatasi infeksi bakteri patogenik mulai dihindari karena efek negatif yang ditimbulkan. Penggunaan antibiotik pada pakan terbukti dapat menyebabkan resistensi bakteri patogenik (Khachatryan *et al.*, 2006) dan berpeluang terjadinya transmisi materi bakteri patogenik dari unggas ke manusia (Bogaard *et al.*, 2001). Pada abad 21 ini, isu keamanan daging dan unggas menjadi perhatian masyarakat, khususnya

yang terkait dengan cara penanganan mikroba patogenik yang memungkinkan terjadinya peningkatan virulensi dan menurunnya dosis infeksi akibat penggunaan antibiotik (Sofos, 2008).

Penggunaan imbuhan pakan bahan alami merupakan cara alternatif untuk mencegah penyakit dan meningkatkan performa ternak. Tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) merupakan salah satu bahan alami yang berpotensi untuk dijadikan imbuhan pakan. Beberapa jenis cacing tanah telah dilaporkan mempunyai senyawa bioaktif dan terbukti dapat menghambat bakteri patogenik. Zat-zat aktif tersebut, antara lain berupa glikolipoprotein G-90 dan fetidin dari cacing *Eisenia foetida* (Annelida, Lumbricidae) (Liu *et al.*, 2004; Popovic *et al.*, 2005), lysozyme dari *E. fetida andrei* (Salzet *et al.*, 2006), hestidin dari cacing *Nereis diversicolor* (Tasiemski *et al.*, 2006) dan cacing tanah *Dendrobaena veneta* (Kalac *et al.*, 2002). Selain mempunyai daya hambat terhadap bakteri patogenik, tepung cacing tanah (*L. rubellus*) banyak mengandung protein, yaitu 63,06% dari bahan kering (Istiqomah *et al.*, 2009) dan mengandung asam amino prolin $\pm 15\%$ dari 62 asam amino (Cho *et al.*, 1998). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak cacing tanah (ECT), ekstrak kering cacing tanah (ECT-k), dan granul ekstrak cacing tanah *L. rubellus* (ECT-g) sebagai imbuhan pakan dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogenik pada ayam broiler.

Materi dan Metode

Pembuatan tepung cacing tanah (TCT)

Cacing tanah (*L. rubellus*) diperoleh dari CV. Kleco Group Yogyakarta. Pembuatan tepung cacing tanah (TCT) mengacu pada metode Edwards (1985)

yang dimodifikasi. Cacing tanah dipisahkan dari media kemudian dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran pada kulit luar dan kotoran pada pencernaan cacing. Kemudian cacing direndam dalam air dingin 4°C selama 24 jam. Asam format 80% ditambahkan sebanyak 3% dari berat cacing. Selanjutnya, cacing digiling menggunakan blender hingga menjadi pasta. Hasil gilingan dikeringkan dalam oven suhu 50°C selama 12 jam dan diayak untuk mendapatkan ukuran partikel yang diinginkan sebesar ± 40 mesh.

Pembuatan ekstrak cacing tanah (ECT)

Ekstrak cacing tanah (ECT) dibuat dengan metode dekokta, yaitu metode ekstraksi dengan air pada suhu 90°C selama 30 menit (Dep. Kes. RI, 2000). Sebanyak 1 bagian TCT ditambahkan air sebanyak 10 bagian dan ditambah lagi air ekstra sebanyak 2 bagian ke dalam panci. Panci tersebut dipanaskan di atas penangas air selama 30 menit terhitung sejak suhu air dalam panci 90°C. Selanjutnya, air dipisahkan dari sisa tepung cacing dengan cara disaring menggunakan kain saring. Filtrat tersebut dipekatkan dengan cara diuapkan disertai penurunan tekanan hingga konsistensinya kental.

Pembuatan ekstrak kering cacing tanah (ECT-k)

Setelah diperoleh ECT, ECT ditimbang, ditempatkan dalam mortar, dan diaduk, kemudian dicampur dengan tepung amilum manihot sedikit demi sedikit hingga tercampur merata dan homogen dengan perbandingan 1:1. Campuran yang telah homogen dituangkan ke dalam loyang lalu dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40° C. Pengeringan dilanjutkan dengan cara dipanaskan di atas *hotplate* tekanan rendah, yaitu pengeringan dengan uap air dan pengipasan. Campuran yang

sudah kering diblender hingga halus, lalu disimpan di dalam plastik kemudian ditutup dengan rapat.

Pembuatan granul ekstrak cacing tanah (ECT-g)

Ekstrak cacing tanah dengan konsistensi tebal dan lengket akan sulit pemberiannya pada ayam broiler *in vivo*. Oleh karena itu, ekstrak kental tersebut dibuat menjadi bentuk granul (bubuk kering). Bentuk sediaan padat (granul) lebih menjamin keakuratan dosis yang diberikan. Ekstrak dicampur dengan bahan pengisi (*filler*) yang sesuai dengan metode granulasi basah. *Filler* yang dipilih untuk ekstrak cacing tanah (ECT) adalah sukrosa dengan pati sebagai agen pengeringan. Tahapan granulasi sebagai berikut: penimbangan ekstrak kental cacing tanah (75,0 g) dan bahan pengisi berupa amilum, sukrosa, PGA, dan CMC-Na (75,0 : 322,5 : 25,0 : 2,5 g), pencampuran ekstrak kental cacing tanah dengan bahan pengisi, pengayakan massa granul basah (6-12 mesh), pengeringan granul basah dalam lemari pengering dengan suhu 40-60°C dan pengayakan kering granul (14-20 mesh) dalam mesin granulasi uji *inprocess* kontrol.

Uji aktivitas antibakteri

Isolat *E. coli* FNCC 0194 dan *S. aureus* 0047 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Pusat Antar Universitas UGM, Yogyakarta, sedangkan isolat *S. pullorum* dan *P. aeruginosa* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan UGM, Yogyakarta. Uji *in vitro* ekstrak cacing tanah digunakan metode difusi agar (Schlegel dan Schmidt, 1994). Dua puluh gram serbuk nutrient agar (NA) dilarutkan di dalam air suling steril 1000 ml. Kemudian, dipanaskan hingga larut dalam labu

Erlenmeyer, disumbat dengan kapas berlemak dan ditutup dengan *aluminum foil*, lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Bakteri uji ditanam pada media pertumbuhan NA miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian bakteri yang diuji disuspensikan dengan cara menumbuhkan bakteri dalam media cair, yaitu NaCl fisiologis, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Parameter uji yang diamati adalah diameter zona hambatan *E. coli*, *S. pullorum*, *P. aeruginosa*, dan *S. aureus*. Inokulum *tersebut* pada fase log (10^7 sel/ml) 1 ml dimasukkan ke dalam cawan petri dan dituangkan media NA yang masih cair 15 ml, dibiarkan hingga memadat. Kemudian dibuat sumuran di tengah cawan dengan menggunakan bor gabus steril Ø 8mm. Campuran ECT, ECT-k atau ECT-g dan air suling steril pada konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam sumuran lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator dan dihitung diameter zona jernih yang terbentuk menggunakan jangka sorong pada jam ke-24.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan konsentrasi penambahan ECT dan ECT-g. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Istiqomah *et al.* (2011), konsentrasi tepung cacing tanah (TCT) yang dicobakan dibagi dengan rendemen ECT sehingga diperoleh konsentrasi ECT dan ECT-g yang dicobakan pada penelitian ini, yaitu perlakuan A : 0%, B : 0,26%, C : 0,52%, D : 0,78%, dan E : 1,04% (g/vol) dalam media *nutrient broth* (NB), masing-masing perlakuan terdiri dari 3 ulangan. Level konsentrasi ECT-g yang dicobakan sama dengan ECT, tetapi disesuaikan dengan

konsentrasinya dalam bahan pengisi (amilum, sukrosa, PGA, dan CMC-Na), yaitu 85%. Data diameter zona hambat dianalisis secara statistik dengan *One-way analysis of variance* (ANOVA) dengan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test*/DMRT (Gomez and Gomez, 2007) untuk membedakan rerata antar perlakuan.

Hasil dan Pembahasan

Pengaruh konsentrasi ekstrak cacing tanah (ECT) terhadap pertumbuhan bakteri patogenik

Data hasil pengamatan diameter zona hambat melalui pengukuran dengan menggunakan jangka sorong setelah *E. coli*, *S. pullorum*, *P. aeruginosa*, dan *S. aureus* diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Data pengukuran diameter zona hambat (mm) ECT terhadap bakteri patogenik

Bakteri Uji	Konsentrasi				
	0%	0,26%	0,52%	0,78%	1,04%
<i>E. coli</i>	0,00 ^a	1,36 ^a	3,19 ^b	3,88 ^b	4,43 ^b
<i>S. pullorum</i>	0,00 ^a	2,07 ^{ab}	4,39 ^b	4,55 ^b	4,96 ^b
<i>P. aeruginosa</i>	0,00 ^a	1,72 ^b	1,49 ^{ab}	3,32 ^c	4,30 ^c
<i>S. aureus</i>	0,00 ^a	2,24 ^b	3,33 ^{bc}	4,59 ^{cd}	5,73 ^d

Pemberian konsentrasi ekstrak cacing tanah (ECT) yang berbeda-beda menunjukkan pengaruh yang berbeda pula terhadap zona hambatan yang dihasilkan. Semakin luas daerah zona hambatan yang terbentuk di sekitar *paper disk*, maka semakin besar pula daya antimikroba yang terdapat pada ekstrak air cacing tanah (*L. rubellus*). Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa konsentrasi ECT 0,52% mulai menunjukkan penghambatan terhadap pertumbuhan *E. coli* ($P < 0,05$) dibandingkan kontrol tanpa ECT (0%) ditunjukkan dengan diameter zona hambatan yang lebih luas terhadap *E. coli* (3,19 mm) dibanding kontrol (0 mm) dan secara umum daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri tersebut meningkat sebanding dengan peningkatan konsentrasi ECT yang ditambahkan. Peningkatan diameter zona hambatan ini adalah akibat efek bakterisida yang menyebabkan kematian *E. coli*. Penghambatan tertinggi hingga terendah berturut-

turut ditunjukkan pada konsentrasi 1, 04%; 0,78%; 0, 52% dan 0, 26%. Pola ini menunjukkan, bahwa daya hambat terhadap bakteri meningkat sebanding dengan peningkatan konsentrasi ECT yang ditambahkan. Hal ini terjadi karena adanya kandungan senyawa bioaktif *Lumbricin I* sebanyak 1 µg dalam 1 gram cacing tanah (*L. rubellus*) (Cho *et al.*, 1998), sehingga dengan peningkatan konsentrasi ekstrak cacing tanah (ECT) maka kandungan senyawa bioaktif *Lumbricin I* tersebut lebih banyak. Julendra dan Sofyan (2007) melaporkan, bahwa tepung cacing tanah mengandung komponen antibakteri yang mampu menghambat aktivitas *E. coli* terutama pada konsentrasi 50% (b/v) tepung cacing tanah.

Penghambatan pertumbuhan *S. pullorum* mulai terlihat pada konsentrasi 0, 52% dari diameter zona hambatan yang lebih luas (4,39 mm) dibandingkan kontrol ($P < 0,05$), sedangkan

konsentrasi dibawah 0,52% belum memberikan efek penghambatan ($P>0,05$). Tabel 1 memperlihatkan bahwa mulai konsentrasi 0, 52% hingga 1, 04%, ECT menunjukkan penghambatan terhadap pertumbuhan *S. pullorum* yang dilihat dari diameter zona hambatan yang lebih luas dibandingkan kontrol ($P<0,05$). Senada dengan penelitian yang dilakukan Damayanti *et al.* (2009), bahwa mulai taraf 0,25%, tepung cacing tanah (TCT) *L. rubellus* efektif menghambat *S. pullorum*. Pada umumnya, diameter zona hambat cenderung meningkat sebanding dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Hal berbeda dengan penelitian Elifah (2010), dimana diameter zona hambat tidak selalu naik sebanding dengan naiknya konsentrasi antibakteri, kemungkinan ini terjadi karena perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar, jenis dan konsentrasi senyawa antibakteri yang berbeda juga memberikan diameter zona hambat yang berbeda pada lama waktu tertentu.

Efek penghambatan ECT terhadap *P. aeruginosa* sudah terlihat pada konsentrasi terendah 0, 26% (1,72 mm) ditunjukkan dengan diameter zona hambatan yang lebih luas dibandingkan kontrol ($P<0,05$). Tingkat kepekaan *P. aeruginosa* tersebut semakin sensitif sebanding dengan penambahan konsentrasi perlakuan hingga taraf 1, 04%. Konsentrasi ECT terendah 0,26% selama 24 jam juga telah menunjukkan penghambatan terhadap pertumbuhan *S. aureus* ($P<0,05$) dibandingkan kontrol tanpa ECT (0%) ditunjukkan dengan diameter zona hambatan yang lebih luas (2,24 mm) dibanding kontrol (0 mm) dan daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri tersebut meningkat sebanding dengan peningkatan konsentrasi ECT yang ditambahkan. Bakteri *S. aureus* merupakan Gram

positif yang pada umumnya mempunyai kepekaan terhadap senyawa antibakteri dibandingkan dengan bakteri Gram negatif karena dinding sel bakteri Gram positif mengandung lapisan peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan dengan dinding sel pada bakteri Gram negative, seperti *E. coli*, *S. pullorum*, dan *P. aeruginosa* (Fardiaz, 1989). Bakteri Gram negatif memiliki stuktur lebih kompleks, yaitu kompleks molekul lipopolisakarida (LPS) yang melindungi sel dari senyawa toksik dan antibiotik, serta membuat stuktur membran luar lebih stabil, lapisan tipis peptidoglikan dan plasma membran (Willey *et al.*, 2009). Struktur dinding sel yang lebih kompleks dan stabil tersebut menyebabkan bakteri Gram negatif lebih resisten terhadap senyawa antibakteri di luar sel dibandingkan bakteri Gram positif yang mempunyai lapisan tunggal peptidoglikan. Pada bakteri Gram positif, 90% dinding selnya terdiri dari lapisan peptidoglikan, sedangkan bakteri Gram negatif lapisan peptidoglikan \pm 5-20%. Senyawa antibakteri dapat mencegah sintesis peptidoglikan pada sel bakteri yang tumbuh, maka bakteri Gram positif pada umumnya lebih peka dibandingkan dengan bakteri Gram negatif.

Popovic *et al.* (2005) menyatakan bahwa efek penghambatan terbaik dari glikolipoprotein campuran G-90 yang terkandung pada cacing tanah *E. foetida* terhadap pertumbuhan bakteri fakultatif-patogenik seperti *S. enteritidis*, *S. aureus*, dan *S. pyogenes* diperoleh pada konsentrasi 10 ng/ml sampai 10 μ g/ml. Berdasarkan diameter zona hambat, G-90 memiliki sensitivitas terhadap *Staphylococcus sp.* sebesar $17\pm 0,43\%$ lebih tinggi dibandingkan antibiotik Gentamicin 10 μ g dan Enrofloxacin 20 μ g (Popovic *et al.*, 2005). Makromolekul dalam

campuran G-90 yang terkandung pada cacing tanah berada pada proporsi keseimbangan biologis. Hal ini menjadi dasar pada penelitian Cooper *et al.* (2002) yang menyatakan bahwa molekul tertentu dari sistem kekebalan cacing tanah mungkin dimanfaatkan sebagai antibiotik alami.

Aktivitas antibakteri atau efek penghambatan terhadap bakteri patogen yang dimiliki oleh cacing tanah berasal dari sel yang terdapat pada saluran intestinal cacing tanah (*chloragocytes*). Cho *et al.* (1998) dan Salzet *et al.* (2006) melaporkan, bahwa *Lumbricin I* yang merupakan senyawa antibakteri yang berhasil diisolasi dan dikarakterisasi dari cacing tanah *L. rubellus*. *Lumbricin I* tersebut mempunyai aktivitas antimikroba berspektrum luas, yaitu menghambat bakteri Gram positif, dan Gram negatif, serta fungi (Cho *et al.*, 1998). Selain itu, cacing tanah kaya dengan senyawa peptida seperti *coelomycetes* (sel dari cairan *coelomic*) yang didalamnya terdapat lisozim yang berperan dalam aktivitas fagositosis serta berfungsi untuk meningkatkan kekebalan (Engelmann *et al.*, 2005).

Lumbricin yang merupakan senyawa antibakteri dalam cacing tanah termasuk dalam golongan peptida antimikroba yang umumnya

dimiliki hewan sebagai bentuk pertahanan alamiah terhadap kehadiran mikroba patogen di lingkungannya (Tasiemski, 2008). Peptida antimikroba memiliki kemampuan untuk merusak membran plasma bakteri patogen dengan cara interaksi elektrostatis dengan dinding sel bakteri sehingga terbentuk lubang ionik atau celah yang menyebabkan terjadinya perubahan pada permeabilitas membran sel (Willey *et al.*, 2009).

Data diameter zona hambatan tersebut menunjukkan bahwa *S. aureus* merupakan bakteri yang paling sensitif terhadap ekstrak cacing tanah. Selanjutnya tingkat kepekaan bakteri terhadap ekstrak cacing tanah berturut-turut setelah *S. aureus* adalah *P. aeruginosa*, *S. pullorum*, dan *E. coli*.

Pengaruh konsentrasi ekstrak kering cacing tanah (ECT-k) terhadap pertumbuhan bakteri patogenik

Data hasil pengamatan diameter zona hambatan ekstrak kering cacing tanah melalui pengukuran dengan menggunakan jangka sorong setelah *E. coli*, *S. pullorum*, *P. aeruginosa*, dan *S. aureus* diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Data pengukuran diameter zona hambatan (mm) ECT-k terhadap bakteri patogen

Bakteri Uji	Konsentrasi				
	0%	0,26%	0,52%	0,78%	1,04%
<i>E. coli</i>	0,00 ^a	2,76 ^b	4,17 ^{bc}	4,26 ^{bc}	6,52 ^c
<i>S. pullorum</i>	0,00 ^a	4,55 ^{ab}	2,32 ^{ab}	4,90 ^{ab}	5,46 ^b
<i>P. aeruginosa</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	5,34 ^b	4,05 ^c	5,88 ^c
<i>S. aureus</i>	0,00 ^a	2,67 ^b	3,83 ^c	6,28 ^d	6,62 ^d

Berdasarkan Tabel 2 dapat diketahui bahwa konsentrasi ECT-k mulai taraf 0,26% sudah menunjukkan penghambatan terhadap pertumbuhan *E. coli* yang dilihat dari diameter zona hambatan yang lebih luas (2,76 mm) dibandingkan kontrol ($P < 0,05$), dan meningkat sebanding dengan konsentrasi ECT-k yang ditambahkan hingga taraf 1,04%. Proses pengeringan ECT dengan penambahan sukrosa terbukti mampu meningkatkan efek penghambatan terhadap *E. coli* dibandingkan ekstrak air cacing tanah (ECT) ditandai dengan daya hambat ECT-k yang mulai terlihat pada konsentrasi terendah 0,26% (2,76 mm) dibanding ECT yang baru terlihat pada konsentrasi 0,52% (3,49 mm). Hal ini kemungkinan karena sukrosa sebagai secara fisik dan kimia stabil, serta kompatibel dengan bahan aktif dalam ekstrak cacing tanah. Penghambatan tertinggi hingga terendah berturut-turut ditunjukkan pada konsentrasi 1,04%; 0,78%; 0,52% dan 0,26%. Pola ini menunjukkan bahwa daya hambat terhadap bakteri meningkat sebanding dengan peningkatan konsentrasi ECT yang ditambahkan.

Konsentrasi 1,04% ECT-k baru menunjukkan penghambatan terhadap pertumbuhan *S. pullorum* yang dilihat dari diameter zona hambatan yang lebih luas (5,46 mm) dibandingkan kontrol ($P < 0,05$). Namun, jika dibandingkan dengan ECT yang sudah menunjukkan efek penghambatan mulai konsentrasi 0,52% (4,39 mm), efek penghambatan ECT-k tersebut lebih rendah.

Efek penghambatan ECT terhadap *P. aeruginosa* mulai terlihat pada konsentrasi 0,52% ditunjukkan dengan diameter zona hambatan yang lebih luas (5,34 mm) dibandingkan kontrol ($P < 0,05$). Namun, jika dibandingkan dengan ECT yang sudah menunjukkan efek penghambatan mulai konsentrasi

0,26% (1,72 mm), efek penghambatan ECT-k tersebut lebih rendah.

Begitu pula dengan konsentrasi ECT-k 0,26% selama 24 jam pengamatan sudah menunjukkan penghambatan terhadap pertumbuhan *S. aureus* dibandingkan kontrol tanpa ECT (0%) ditunjukkan dengan diameter zona hambatan yang lebih luas (2,67 mm) dibanding kontrol. Hasil ini konsisten dengan diameter zona hambat pada penambahan ECT yang juga menunjukkan efek penghambatan yang mulai terlihat pada taraf 0,26%.

Hasil pengujian menunjukkan diameter zona penghambatan pada bakteri gram positif *S. aureus* secara umum cenderung lebih besar daripada bakteri gram negatif *E. coli*, *S. pullorum*, dan *P. aeruginosa*.

Secara keseluruhan data diameter zona hambat pada Tabel 1 dan 2 menunjukkan bahwa diameter zona hambat pada bakteri gram positif (*S. aureus*) untuk semua konsentrasi penambahan ECT maupun ECT-k cenderung lebih besar dibandingkan bakteri gram negatif (*E. coli*, *S. pullorum*, dan *P. aeruginosa*). Hal ini diakibatkan adanya perbedaan sensitivitas bakteri terhadap antibakteri yang dipengaruhi oleh struktur dinding sel bakteri. Bakteri gram positif cenderung lebih sensitif terhadap antibakteri, karena struktur dinding sel bakteri gram positif lebih sederhana dibandingkan struktur dinding sel bakteri gram negatif sehingga memudahkan senyawa antibakteri untuk masuk ke dalam sel bakteri gram positif. Dinding sel *S. aureus* disusun oleh rantai tetrapeptida yang terdiri dari L-alanil-D-isoglutaminil-L-lisil-D-alanin dan jembatan interpeptida yang terdiri dari lima unit glisin. Unit-unit tersebut merupakan komponen penyusun peptidoglikan yang sangat sensitif terhadap senyawa antimikroba. Peptidoglikan terdiri

dari turunan gula yaitu asam N-asetilglukosamin dan asam N-asetilmuramat serta asam amino L-alanin, D-alanin, D-glutamat, dan lisin dengan lapisan tipis asam teikoat dan asam teikuronat yang bermuatan negatif (Madigan *et al.*, 2000). Sesuai hasil penelitian yang dilakukan oleh Kusmayati dan Agustini (2007), ekstrak etanol *P. cruentum* yang mengandung senyawa antibakteri flavonoid, mampu menghambat lebih besar bakteri Gram positif daripada bakteri gram negatif. Proses ekstraksi senyawa antibakteri juga berpengaruh terhadap aktivitasnya.

Pengaruh konsentrasi granul ekstrak cacing Tanah (ECT-g) terhadap pertumbuhan bakteri patogenik

Data hasil pengamatan diameter zona hambat granul ekstrak cacing tanah melalui pengukuran dengan menggunakan jangka sorong setelah bakteri *E. coli*, *S. pullorum*, *P. aeruginosa*, dan *S. aureus* diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C tersaji pada Tabel 3.

Tabel 3. Data pengukuran diameter zona hambat (mm) ECT-g terhadap bakteri patogenik

Bakteri Uji	Konsentrasi				
	0%	0,26%	0,52%	0,78%	1,04%
<i>E. coli</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	5,07 ^a	0,00 ^a
<i>S. pullorum</i>	0,00 ^a	16,82 ^c	11,04 ^b	12,67 ^b	26,35 ^d
<i>P. aeruginosa</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	2,46 ^a	13,14 ^b
<i>S. aureus</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	8,48 ^b	10,74 ^b	5,63 ^b

Berdasarkan Tabel 3 diketahui bahwa ECT-g tidak dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* ($P > 0,05$). Tidak adanya daya hambat terhadap *E. coli* pada granul ECT dibandingkan ECT dan ECT-g kemungkinan besar disebabkan rendahnya kandungan ECT dalam granul ECT (15%) akibat tingginya kandungan bahan pengisi (amilum, sukrosa, PGA, dan CMC-Na) yaitu 85% sehingga kandungan zat aktif dalam ekstrak cacing tanah semakin sedikit.

Penghambatan terhadap *S. pullorum* terlihat pada konsentrasi 0,26% ditunjukkan dengan diameter zona hambat (16,82 mm) yang lebih luas dibandingkan kontrol (0 mm), namun dengan peningkatan konsentrasi hingga level 0,78% menunjukkan penurunan daya hambat ($P < 0,05$),

kemudian meningkat lagi daya hambatnya pada konsentrasi ECT-g tertinggi (1,04%).

Efek penghambatan terhadap *S. pullorum* mulai terlihat pada konsentrasi 0,26% (16,82 mm), namun menurun efektifitasnya pada konsentrasi 0,52% (11,04 mm) dan 0,78% (12,67 mm), dan menunjukkan aktivitas optimumnya pada konsentrasi 1,04% dengan zona penghambatan yang sangat luas (26,35 mm).

Pada *S. aureus* penghambatan mulai terlihat pada konsentrasi 0,52% ditunjukkan dengan diameter zona hambat 8,48 mm dan paling optimal pada konsentrasi 0,78% (10,74 mm) dibandingkan kontrol, namun pada konsentrasi 1,04% terjadi penurunan (5,63 mm). Penurunan aktivitas ini dimungkinkan adanya sifat resistensi dari bakteri uji terhadap zat aktif dalam TCT pada taraf pemakaian lebih dari 50%.

Selain itu, tingginya kadar TCT melebihi 50% dalam media diduga dapat menghambat penetrasi senyawa aktif antimikroba ke dalam sel bakteri. Hal ini berdampak pada menurunnya daya hambat TCT terhadap pertumbuhan bakteri uji. Engelmann *et al.* (2005) menyatakan bahwa mekanisme kerja zat aktif pada cacing tanah terjadi pada tingkat dalam sel. Ini berarti bahwa jika senyawa aktif terhambat masuk ke dalam sel dapat berpengaruh menurunnya kerja zat aktif antibakteri dalam menghambat *E. coli*. Menurunnya efektifitas daya hambat TCT diduga mempunyai kesamaan dengan mekanisme penurunan efektifitas antibiotik apabila dipakai melebihi dosis dapat menyebabkan resistensi bakteri patogen. Efektivitas penghambatan zat antibakteri seperti antibiotik terhadap *E. coli* dipengaruhi oleh dosis pemakaian dan jenis antibiotik itu sendiri (Schroeder *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004). Pemakaian zat aktif antibakteri jika kurang ataupun melebihi dosis optimal tidak hanya dapat menyebabkan penurunan daya hambat tetapi juga dapat menyebabkan resistensi bakteri patogenik.

Data diameter zona hambatan pada Tabel 3 menunjukkan bahwa *S. pullorum* merupakan bakteri yang paling sensitif terhadap granul ekstrak cacing tanah (ECT-g) dibandingkan bakteri patogen lainnya. Aktivitas antibakteri yang dimiliki TCT *L. rubellus* berasal dari *Lumbricin I* yang merupakan senyawa antibakteri yang berhasil diisolasi dan dikarakterisasi dari cacing tanah *L. rubellus* (Cho *et al.*, 1998; Salzet *et al.*, 2006). Cho *et al.* (1998) menyatakan bahwa hasil uji *in vitro* menunjukkan *Lumbricin I* mempunyai aktivitas antimikroba berspektrum luas, yaitu menghambat bakteri Gram positif, bakteri Gram negatif dan fungi. Mekanisme penghambatan *Lumbricin I* terhadap mikroba

sampai saat ini belum diketahui secara pasti. Beberapa jenis peptida antimikroba yang sejenis dengan *Lumbricin* antara lain: *apidaecins*, *bactenecins* dan antimikroba 'PR-39'. Mekanisme penghambatan *bactenecins* terhadap bakteri dengan cara meningkatkan permeabilitas membran sehingga kehilangan metabolit sel dan PR-39 diketahui mampu menghambat sintesis protein dan DNA dalam sel.

Tepung cacing tanah (TCT) dalam berbagai bentuk sediaan, yaitu ekstrak cair (ECT), ekstrak kering (ECT-k) dan granul (ECT-g) terbukti *in vitro* mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogenik *E. coli*, *S. pullorum*, *P. aeruginosa* dan *S. aureus*. Aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri telah terlihat pada konsentrasi terendah yaitu 0,26% dan cenderung mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan konsentrasi yang diberikan dan optimal pada konsentrasi 1,04%. Konsentrasi ECT, ECT-k, dan ECT-g yang paling efektif menghambat bakteri patogenik tersebut, yaitu konsentrasi 1,04%. *Staphylococcus aureus* memiliki sensitivitas tinggi terhadap ECT, ECT-k, dan ECT-g dibandingkan dengan *E. coli*.

Daftar Pustaka

- Bogaard, V. D., A.E., N. London, C. Driessen, and E.E. Stobberingh. (2001) Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemoter.* 47: 767-771.
- Cho, J.H., C.B. Park, Y.G. Yoon, and S.C. Kim. (1998) *Lumbricin I*, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1408: 67-76.
- Copper, E. L., A. Beschin, and M. Bilej. (2002) A

- New Model for Analyzing Antimicrobial Peptides with Biomedical Applications. 1st ed. NATO Science. New York. pp. 343-348.
- Damayanti, E., A. Sofyan, H. Julendra, dan T. Untari. (2009) Pemanfaatan tepung cacing tanah *Lumbricus rubellus* sebagai agensia anti-pullorum dalam imbuhan pakan ayam broiler. *JITV* 14(2): 83-89.
- Elifah, E. (2010) Uji Antibakteri Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Senggani (*Melastoma candidum*, D.Don) Terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* Serta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya. Skripsi. UNS, Surakarta.
- Engelmann, P., E.L. Cooper, and P. Németh. (2005) Anticipating innate immunity without a toll. *Mol. Immunol.* 42: 931-42.
- DEP. KES. RI. (2000) Acuan Sediaan Herbal. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Edwards, C. A. (1985) Production of feed protein from animal waste by earthworms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 310: 299-307.
- Fardiaz, S. (1989) Penuntun Praktek Mikrobiologi Pangan. IPB Press, Bogor.
- Gomez, K. A. and A. A. Gomez. (2007) Statistical Procedures for Agricultural Research. 2nd ed. Terjemahan: E. Sjamsudin dan J.S. Baharsjah. UI Press, Jakarta.
- Istiqomah, L., A. Sofyan, E. Damayanti, and H. Julendra. (2009) Amino acid profile of earthworm and earthworm meal (*Lumbricus rubellus*) for animal feedstuff. *J. Indonesian Trop. Anim. Agric.* 34(4): 253-257.
- Julendra, H. dan A. Sofyan. (2007) Uji in-vitro penghambatan aktivitas *Escherichia coli* dengan tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*). *Med. Pet.* 30: 41-47.
- Kalac, Y., A. Kimiran, G. Ulakoglu, and A. Cotuk. (2002) The role of opsonin in phagocytosis by coelomocytes of earthworm *Dendrobaena veneta*. *J. Cell Mol. Biol.* 1: 7-14.
- Khachatryan, A.R., T.E. Besser, D.D. Hancock, and D.R. Call. (2006) Use of a nonmedicated dietary supplement correlates with increased prevalence of streptomycinsulfa- tetracycline-resistant *Escherichia coli* on a dairy farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4583-4588.
- Knobl T., T.A.T. Gomes, M.A.M. Vieira, J.A. Bottino and A.J.P.Ferreira. (2006) Occurance of adhesin-encoding operons in *Escherichia coli* isolated from breeder with salpingitis and chick with omphalitis. *Braz J Microbiol* 37.
- Kusmayati dan Agustini, N. W. R. (2007) Uji aktivitas senyawa antibakteri dari mikroalga (*Porphyridium cruentum*). *Biodiversitas.* 8(1): 48-53.
- Liu, Y-Q., Z-J. Sun, C. Wang, S-J. Li, and Y-Z. Liu. (2004) Purification of a novel antibacterial short peptide in earthworm *Eisenia foetida*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 36: 297-302.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker. (2000) Brock Biology of Microorganisms. 9th ed. Prentice-Hall International, Inc., London.
- Mcmullin, P. (2004) A Pocket Guide to Poultry Health and Disease. 5M Enterprises Limited. Sheffield.
- Mellata M., M. Dho-Moulin, C.M. Dozois, M. Curtiss, P.K. Brown, P. Arne, A. Bree, C. Dasautels, and J.M. Fairbrother. (2003) Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *J. Infect. Immun.* 71: 536-540.
- Popovic, M., M. Grdisa, and T.M. Hrzenjak. (2005) Glycolipoprotein G-90 obtained from the earthworm *Eisenia foetida* exerts antibacterial activity. *Veterinarski Arhiv.* 75: 119-128.
- Salzet, M., A. Tasiemski, and E. Cooper. (2006) Innate immunity in Lophotrochozoans: The Annelids. *Curr. Pharm. Des.* 12: 1-8.
- Schlegel, H.G. and K. Schmidt. (1994) Mikrobiologi Umum. Terjemahan: R.M.T. Baskoro. Universitas Gadjah Mada (UGM) Press, Yogyakarta.
- Schroeder, C.M., J. Meng, S. Zhao, C. DeRoy, J. Torcolini, C. Zhao, P. F. McDermott, D.D. Wagner, R.D. Walker, and D.G. White. (2002) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*

- O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1409-1414.
- Shivaprasad, H.L. (2003) Pullorum disease and fowl typhoid. In: *Disease of Poultry*. Saif, Y.M. (Ed). 11th ed. Iowa State Press, Ames, Iowa.
- Sofos, J.N. (2008) Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat Sci.* 78: 3-13.
- Tabbu, CR. (2000) *Penyakit Ayam dan Penanggulangannya*. Kanisius, Yogyakarta.
- Tasiemski, A., D. Schikorski, F. LE Marrec-Croq, C.P-V. Camp, C. Boidin-Wichlacz, and P.E. Sautiere. (2006) Hestidin: A novel antimicrobial peptide containing bromotryptophan constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, *Nereis diversicolor*. *Dev. Comp. Immunol.* 31: 749-762.
- Willey J.M., L.M. Sherwood, and C.J. Woolverton. (2009) *Prescott's Principles of Microbiology*. McGraw-Hill International Edition, New York.
- Wooley R.E., P.S. Gibbs, T.P. Brown, and J.J. Maurer. (2000) Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* Isolates. *Avian Dis.* 44:318-324.
- Yang, H., S. Chen, D.G. White, S. Zhao, P. McDermott, R. Walker, and J. Meng. (2004) Characterization of multiple-antimicrobialresistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3483-3489.