

A. THALIB *et al.*: Teknik penyiapan sediaan mikroba anaerobik

TEKNIK PENYIAPAN SEDIAAN MIKROBA ANAEROBIK: BAKTERI SELULOLITIK BATANG

AMLIUS THALIB, B. HARYANTO, KUSWANDI, H. HAMID dan MULYANI

Balai Penelitian Ternak, PO. Box 221, Bogor 16002

(Diterima dewan redaksi 18 Oktober .2001)

ABSTRACT

THALIB, A., B. HARYANTO, KUSWANDI, H. HAMID and MULYANI. 2001. Technique for preparation of anaerobic microbes: Rod-shaped cellulolytic bacteria. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6 (3): 153-157.

Preparation of anaerobic-rod cellulolytic bacteria with coating technique has been conducted. Steps of the processes involved were cultivation, coating, evaporation, and drying. Coating agent used was Gum Arabic, and drying techniques conducted were freeze drying and sun drying. pH of culture media was firstly optimized to obtain the maximal population of bacteria. Both coated and uncoated preparates were subjected to drying. Morphological and Gram type identifications showed that uncoated preparate dried with freeze drying is not contaminated (ie. all bacteria are rod shape with Gram-negative type) while the one dried with sun drying is not morphologically pure (ie. containing of both rod and coccus shapes with Gram negative and positive). The coated preparates dried by both freeze and sun drying, were not contaminated (ie. all are rods with Gram-negative). The coating and drying processes decreased viability of preparates significantly. However, the decreasing of viability of coated preparate are lower than uncoated preparate (ie. 89 vs. 97%). Total count of bacteria in sun-drying coated preparate are higher ($P < 0.05$) than the uncoated preparate (ie. 3.38×10^{10} vs. 1.97×10^{10} colony/g DM). Activity of sun-drying coated preparate to digest elephant grass and rice straw was higher ($P < 0.01$) than the sun-drying uncoated preparate with the *in vitro* DMD values were 42.7 vs. 35.5% for elephant grass substrate and 29.3 vs. 24.6% for rice straw substrate. Therefore, it is concluded that coating technique has a positive effects on the preparation of rumen bacteria.

Key words : Anaerobic bacteria, coating, drying

ABSTRAK

THALIB, A., B. HARYANTO, KUSWANDI, H. HAMID dan MULYANI. 2001. Teknik penyiapan sediaan mikroba anaerobik : bakteri selulolitik batang. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6 (3): 153-157.

Penyiapan sediaan bakteri selulolitik batang anaerobik dengan teknik *coating* telah dilakukan. Tahap-tahap proses penyiapan yang dilakukan mencakup pembiakan, *coating*, penguapan dan pengeringan. Zat *coating* yang digunakan adalah *Gum Arabic*, dan pengeringan dilakukan secara pengeringan beku (*freeze drying*) dan pengeringan matahari. pH media biakan terlebih dahulu dioptimalkan untuk memperoleh pertumbuhan bakteri secara maksimal. Sediaan yang dengan *coating* maupun tanpa *coating* disiapkan dalam bentuk kering. Identifikasi morfologis dan uji Gram memperlihatkan bahwa sediaan tanpa *coating* yang dikeringkan secara *freeze drying* tidak mengalami kontaminasi (yakni berbentuk batang dengan tipe Gram-negatif), sedangkan yang dikeringkan dengan matahari mengalami kontaminasi (yakni terdiri dari campuran bentuk batang dan coccus dengan tipe Gram-negatif dan positif). Sediaan dengan *coating* baik yang dikeringkan secara *freeze drying* maupun matahari, tidak mengalami kontaminasi (yakni hanya terdiri dari bentuk batang dengan tipe Gram-negatif). Proses *coating* dan pengeringan menyebabkan penurunan viabilitas bakteri dalam sediaan secara signifikan. Namun proses pengeringan untuk sediaan bakteri dengan *coating* memperlihatkan penurunan viabilitas bakteri yang lebih rendah daripada sediaan yang tanpa *coating* (89 vs. 97 %). Populasi sediaan bakteri kering matahari dengan perlakuan *coating* lebih tinggi ($P < 0,05$) daripada yang tanpa perlakuan *coating* ($3,38 \times 10^{10}$ vs. $1,97 \times 10^{10}$ koloni/ g BK). Aktivitas sediaan bakteri dengan *coating* jemur matahari dalam mencerna substrat rumput gajah dan jerami padi lebih tinggi ($P < 0,01$) daripada sediaan bakteri tanpa *coating* dengan perbandingan nilai *in vitro* DMD berturut-turut: 42,7% vs. 35,5% dan 29,3% vs. 24,6%. Dengan demikian teknik *coating* disimpulkan akan bermanfaat untuk sistem penyiapan dan penyimpanan sediaan probiotik anaerobik.

Kata kunci: Bakteri anaerobik, *coating*, pengeringan.

PENDAHULUAN

Perbedaan morfologis dan tipe struktur dinding sel memperlihatkan adanya perbedaan karakteristik aktivitas dalam mencerna serat kasar (THALIB *et al.*, 2000). Pemisahan bakteri selulolitik rumen menurut morfologinya telah dilakukan berupa produk sediaan

(cair) bakteri, dan evaluasinya telah dilakukan pada domba. Diperlihatkan bahwa sediaan bakteri selulolitik batang dapat memperbaiki PBBH domba (yakni $\pm 25\%$) dengan FCR ± 3 poin lebih baik daripada kontrol (THALIB *et al.*, 2001).

Sediaan probiotik dalam bentuk padat lebih praktis daripada bentuk cair. Untuk mempertahankan

viabilitasnya, diperlukan bakteri dalam sediaan padat serta tidak mudah terkontaminasi.

Viabilitas dan resistensi mikroba dalam sediaan probiotik merupakan parameter yang sangat penting dan menentukan keberhasilan proses penyiapan sediaan mikroba (probiotik) hingga ke bentuk produk akhir. Mikroba anaerobik sensitif terhadap banyak parameter lingkungan (antara lain udara, pH dan suhu). Oleh karena itu perlu didapatkan teknik proteksi terhadap mikroba anaerobik yang disiapkan dalam bentuk produk akhir. Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan teknik *coating* atau penyalutan. Teknik ini telah banyak dilakukan pada industri makanan (*food industry*) sebagaimana yang telah dibahas oleh DZIEZAK (1988).

Beberapa teknik mikroenkapsulasi telah banyak dikembangkan dan dimanfaatkan secara komersial seperti: *spray drying*, *air suspension coating*, *extrusion*, *spray cooling*, *spray chilling*, *centrifugal extrusion*, *rotational suspension separation*, *coacervation*, dan *complexing*. Sehubungan dengan tujuan untuk proteksi viabilitas dan kemurnian sediaan sel-sel bakteri anaerobik, telah diteliti teknik penyalutan untuk sediaan bakteri selulolitik batang. Sistem penyalutan pada proses penyiapan sediaan probiotik padat sangat bermanfaat untuk melindungi bakteri dari pengaruh lingkungan, sehingga dengan demikian sediaan probiotik yang dihasilkan dapat memberikan nilai-nilai spesifikasi yang stabil.

MATERI DAN METODE

Isolat bakteri rumen selulolitik yang digunakan (berasal dari rumen kerbau), terlebih dahulu dipisahkan dan dimurnikan secara morfologis dan diikuti dengan uji tipe Gram menurut prosedur THALIB *et al.* (2000). Bakteri batang disiapkan sebagai produk inokulum yang dinamakan "Probiotik SR".

Sebelum tahap pembiakan, dilakukan optimasi media biakan yakni dengan mengoptimalkan pH dan komposisi media. Media dengan kapasitas biakan yang tertinggi digunakan untuk perbanyak Probiotik SR dengan serbuk selulosa sebagai zat pembawa (*carrier*). Kemudian dilanjutkan ke tahap perlakuan berikut :

1. Sediaan probiotik SR tanpa penyalutan (*coating*): diuapkan, lalu dikeringkan dengan *freeze drier* dan sinar matahari. Proses penguapan dilakukan dengan "Rotavapor" pada suhu 50° C.
2. Sediaan Probiotik SR dengan penyalutan: sebelum dikeringkan ditambah bahan penyalut (*coating agent*), lalu diaduk dengan alat homogenizer. Kemudian diteruskan ke proses penguapan dan selanjutnya dikeringkan dengan *freeze drier* dan sinar matahari.

Pengukuran dan pengamatan yang dilakukan terhadap sediaan probiotik SR:

1. Morfologi sel bakteri diamati secara mikroskopik dengan *Olympus Biological Microscope CH₂ series*, no. SL 0149.
2. Tipe dinding sel bakteri diuji menurut prosedur LAY (1994)
3. Total bakteri dihitung menurut prosedur OGIMOTO dan IMAI (1981)
4. Aktivitas: kemampuan sediaan bakteri mencerna substrat didasarkan pada nilai DMD substrat menurut prosedur THEODOROU dan BROOKS (1990). Sebagai substrat digunakan serbuk jerami padi dan rumput gajah.

Untuk mengetahui perbedaan nilai rata-rata antar perlakuan digunakan uji t menurut STEEL dan TORRIE (1980).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keasaman (pH) media biakan dioptimasi untuk memperoleh pertumbuhan bakteri secara optimal (Tabel 1).

Pertumbuhan bakteri batang (yang diuji) memperlihatkan sensitif terhadap perubahan pH media. Total bakteri dalam media biakan pH 6,2 (M₂) adalah yang tertinggi, dan menunjukkan perbedaan sangat nyata (P<0,01) dibandingkan dengan media biakan standar (M₄). Sehingga dengan demikian, data/hasil percobaan yang ditampilkan pada tabel-tabel berikutnya, adalah hasil biakan dengan media pH 6,2 (M₂).

Isolat bakteri yang digunakan dan dikembangkan dalam percobaan ini adalah bakteri selulolitik batang dengan tipe dinding sel Gram-negatif. Identifikasi morfologis dan uji Gram setelah dikembangkan dalam berbagai perlakuan media memperlihatkan bahwa tidak terjadi kontaminasi selama proses pembiakan (Tabel 1).

Bakteri selulolitik rumen berbentuk batang yang utama adalah *Fibrobacter (Bacteroides) succinogenes* dan *Butyrivibrio fibrisolvens* dan *Clostridium lochheadii* dalam jumlah sedikit. *B. Succinogenes* lebih utama daripada *B. fibrisolvens*, tapi walaupun *C. lochheadii* kehadirannya di dalam rumen tidak selazim yang lainnya, bakteri ini dikenal sebagai pencerna selulosa yang paling cepat.

Viabilitas dan aktivitas bakteri-bakteri ini sangat dipengaruhi oleh pH media. *B. succinogenes* tidak toleran terhadap pH <5,9 sedangkan *B. fibrisolvens* lebih resisten terhadap pH rendah (RUSSELL dan WILSON, 1996). Secara umum, pH media optimum untuk pertumbuhan dan aktivitas bakteri selulolitik berada dalam kisaran 6-7 (CHURCH, 1979). pH media yang optimum yang didapatkan dalam percobaan ini adalah pada 6,2 (Tabel 1).

Tabel 1. Pengaruh pH media biakan terhadap populasi bakteri batang.

Media biakan	pH	Total bakteri (x 10 ⁹ koloni/ml)	Morfologis	Uji Gram
M ₁	5,9	2,70 ^b	Batang	Negatif
M ₂	6,2	12,14 ^d	Batang	Negatif
M ₃	6,5	1,31 ^a	Batang	Negatif
M ₄ (*)	6,8	4,64 ^c	Batang	Negatif
M ₅	7,0	1,41 ^a	Batang	Negatif

Keterangan: (*) Media biakan standar (yang digunakan secara rutin). Perbedaan tanda huruf menunjukkan perbedaan nilai total bakteri secara sangat nyata ($P < 0,01$).

Pengaruh pengeringan dan penyalutan terhadap kemurnian dan viabilitas bakteri dalam sediaan inokulum Probiotik SR diperlihatkan pada Tabel 2.

Pengeringan sediaan inokulum (penyalutan maupun tanpa penyalutan) dapat dilakukan dengan cara pengeringan beku tanpa mengalami kontaminasi. Namun pengeringan dengan matahari menyebabkan terjadi kontaminasi terhadap sediaan inokulum tanpa *coating*, sedangkan yang dengan penyalutan tidak terjadi kontaminasi.

Proses pengeringan sangat berpengaruh terhadap viabilitas bakteri, yakni populasinya menurun puluhan kali dari populasi awal. Sedangkan proses penyalutan juga dapat menyebabkan penurunan populasi bakteri, akan tetapi sangat bermanfaat untuk mencegah kemurnian walaupun hanya pada pengeringan dengan cahaya matahari

Penyalutan sel/koloni bakteri dalam percobaan ini bertujuan untuk memproteksi sensitivitas bakteri dari pengaruh lingkungan serta mempertahankan kemurnian (morfologis) dan viabilitas dalam bentuk sediaan sehingga dapat disimpan dalam jangka waktu yang cukup lama. Disamping itu penyiapan sediaan bakteri melalui pengeringan mengalami pengaruh perubahan-perubahan faktor lingkungan selama proses berjalan.

Pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan, viabilitas mikroorganisme akan menurun dengan cepat. Oleh sebab itu menurut HAVENAAR *et al.* (1992), sistem penyimpanan untuk sediaan mikroorganisme seperti teknik enkapsulasi/*coating* perlu dipertimbangkan. Teknik enkapsulasi berhasil diterapkan untuk immobilisasi sel-sel tanaman (BRODELIUS dan MOSBACH, 1982). Review mengenai berbagai teknik enkapsulasi/penyalutan bahan-bahan makanan termasuk partikel bahan makanan mikro yang telah berkembang di industri makanan dilaporkan oleh DZIEZAK (1988).

Dalam percobaan ini, teknik penyalutan untuk sediaan inokulum (Probiotik SR) telah memperlihatkan

hasil yang positif (Tabel 2), terutama terhadap tingkat kemurnian bakteri dalam sediaan. Namun, tahapan yang dialami selama proses penyalutan dan pengeringan telah menyebabkan penurunan viabilitas yang sangat signifikan. Penurunan viabilitas bakteri terutama dimungkinkan akibat kemasukan udara selama tahap homogenisasi dalam proses penyalutan. Penurunan viabilitas sediaan bakteri dalam proses pengeringan dengan *freeze drier* kemungkinan akibat perbedaan resistensi bakteri terhadap suhu dingin, sebagaimana dilaporkan oleh KLAENHAMMER dan KLEEMAN dalam sitasi HAVENAAR *et al.* (1992) bahwa bakteri-bakteri tertentu tidak resisten terhadap suhu dingin (yakni -20°C atau lebih rendah lagi). Sistem pengeringan dengan *freeze drier* dapat mencegah kontaminasi dari faktor luar (Tabel 2), namun sistem ini sangat mahal dan kurang praktis untuk skala besar dibandingkan dengan pengeringan matahari. Kontaminasi sediaan bakteri selama proses pengeringan dengan jamur matahari dapat teratasi setelah melalui proses penyalutan (Tabel 2).

Pengaruh penyalutan terhadap aktivitas sediaan inokulum (Probiotik SR) diperlihatkan pada Tabel 3.

Aktivitas inokulum Probiotik SR diukur berdasarkan kemampuannya mencerna substrat. Aktivitas inokulum tanpa penyalutan menurun sangat nyata ($P < 0,01$) apabila proses pengeringan sediaan inokulum dilakukan secara pengeringan sinar matahari. Namun aktivitas sediaan inokulum yang dijemur matahari dapat dipertahankan melalui teknik penyalutan.

Pengaruh positif penyalutan terhadap aktivitas sediaan bakteri (Tabel 3) makin mengukuhkan bahwa teknik ini memberikan harapan untuk mendorong pengembangan produksi sediaan bakteri anaerobik seperti bakteri rumen unggul.

Tabel 2. Pengaruh pengeringan dan penyalutan terhadap kemurnian dan viabilitas inokulum Probiotik SR yang disiapkan dengan serbuk selulosa sebagai zat pembawa.

Pengamatan/pengukuran	Inokulum		
	cair/suspensi	Pengeringan beku	Pengeringan matahari
I. Tanpa penyalutan:			
• Morfologis	Batang	Batang	Batang dan Coccus
• Uji gram	Negatif	Negatif	Negatif dan Positif
Total bakteri:			
(koloni/mL)	8,52 x 10 ⁹	-	-
(koloni/g BK)	7,10 x 10 ¹¹ b (y)	2,08 x 10 ¹⁰ a	1,97 x 10 ¹⁰ a (y)
II. Penyalutan:			
• Morfologis	Batang	Batang	Batang
• Uji gram	Negatif	Negatif	Negatif
Total bakteri:			
(koloni/mL)	2,51 x 10 ⁹	-	-
(koloni/g BK)	2,09 x 10 ¹¹ q (x)	2,39 x 10 ¹⁰ p	-3,38 x 10 ¹⁰ p (x)

Keterangan: Perbedaan tanda huruf :

a vs b dan p vs q : menunjukkan perbedaan sangat nyata (P<0,01) untuk data/angka yang terletak pada baris yang sama

x vs y : menunjukkan perbedaan sangat nyata (P<0,01) untuk data/angka yang terletak pada kolom yang sama.

Tabel 3. Pengaruh *coating* terhadap aktivitas sediaan inokulum Probiotik SR

Substrat yang dicerna	Daya cerna sediaan inokulum Probiotik SR	
	Pengeringan beku	Pengeringan matahari
Inokulum tanpa penyalutan:		
Rumput gajah	44,28 % ^b	33,50 % ^a
Jerami padi	29,26 % ^b	24,60 % ^a
Inokulum yang disalut:		
Rumput gajah	45,20 %	42,69 %
Jerami padi	27,88 %	29,32 %

Keterangan: Perbedaan tanda huruf menunjukkan perbedaan sangat nyata (P<0,01) antara nilai-nilai daya cerna yang terletak pada baris yang sama

KESIMPULAN

Disimpulkan dari hasil percobaan ini bahwa pH media biakan yang terbaik untuk isolat bakteri sellulolitik batang yang digunakan adalah 6,2. Teknik penyalutan bermanfaat untuk proses penyiapan sediaan bakteri anaerobik, yakni dapat mempertahankan kemurnian, viabilitas dan aktivitas bakteri dalam bentuk sediaan padat yang dikeringkan secara jemur matahari.

DAFTAR PUSTAKA

- BRODELIUS, P and K. MOSBACH. 1982. Immobilized Plant Cells. In: *Advances in Applied Microbiology*, (Ed. A.I. Laskin). Acad. Press, N.Y.: 1 - 26.
- CHURCH, D.C. 1979. *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. Prentice Hall, New Jersey.
- DZIEZAK, D. 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*. (April): 136 - 151.
- HAVENAAR, R., B.T. BRINK and J.H. IN'TUELD. 1992. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller (ed). *Probiotics*. Chapman & Hall., London : 209 - 224.

- LAY, B.W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium P.T. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- OGIMOTO, K and S. IMAI. 1981. *Atlas of Ruemen Microbiology*. Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo.
- RUSSELL, J.B. and D.B. WILSON. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH ?. *J. Dairy Sci.*, 79: 1503 - 1509.
- STEEL, R.G.D. and J.H. TORRIE. 1980. *Principles and Procedures of Statistic. A Biometrical Approach*. McGraw Hill Int. Book Co., Singapore.
- THALIB, A., B. HARYANTO, S. KOMPIANG, I.W. MATHIUS dan A. AINI. 2000. Pengaruh mikromineral dan fenilpropionat terhadap performans bakteri selulolitik *cocci* dan *batang* dalam mencerna serat hijauan pakan. *JITV*, 5(2) : 92 - 99.
- THALIB, A., B. HARYANTO, H. HAMID, D. SUHERMAN dan MULYANI. 2001. Pengaruh kombinasi defaunator dan probiotik terhadap ekosistem rumen dan performans ternak domba. *JITV*, in press.
- THEODOROU, M.K and A.E. BROOKS. 1990. Evaluation of a New Laboratory Procedure for Estimating the Fermentation Kinetics of Tropical Feeds. Annual Report. AFRC Inst. Hurley, Meidenhead, UK.