

Uji *in Vitro* Penghambatan Aktivitas *Escherichia coli* dengan Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*)

H. Julendra & A. Sofyan

Bagian Pakan dan Nutrisi Ternak,
Balai Pengembangan Proses dan Teknologi Kimia (BPPTK) – LIPI
Jl. Yogyakarta-Wonosari Km. 31, Gading, Playen, Gunung Kidul, Yogyakarta 55861
Email: hardi.julendra@lipi.go.id
(Diterima 14-08-2006; disetujui 15-02-2007)

ABSTRACT

This research was conducted to study the inhibition growth of *E. coli* by using earthworm (*Lumbricus rubellus*) meal. The earthworm meal was used in various concentrations, i.e. 0, 25, 50, 75 and 100 mg of earthworm meal in 100 ml DMSO for 0%, 25%, 50%, 75% and 100% (w/v) as treatments respectively. Data were analyzed by ANOVA in Randomized Complete Block Design. Duncan's multiple range test and polynomials orthogonal were used. Inhibition effects were measured through agar well diffusion test. Results showed that earthworm meal contain antibacterial compound which inhibit *E. coli* activity. There was a significant difference ($P < 0.05$) between earthworm meal treatments and control. The best antimicrobial effect was found in treatment of 50% (w/v) of earthworm meal and significantly higher than those of 25, 75 and 100% (w/v), but 25% (w/v) was not different ($P > 0.05$) with 75% (w/v). It is concluded that earthworm meal is capable to inhibit *E. coli* in-vitro at the optimum level of 50% (w/v).

Key words: earthworm meal, E. coli, in-vitro, agar well diffusion

PENDAHULUAN

Pemakaian suplemen pakan (feed supplement) dalam budidaya peternakan sangat bermanfaat dalam meningkatkan performa dan kesehatan ternak. Suplemen pakan ini dapat berupa asam amino, mineral dan vitamin atau gabungannya yang diberikan untuk mencukupi kebutuhan vitamin, mineral dan asam amino serta ditujukan untuk mencegah perkembangan penyakit tertentu pada ternak. Beberapa penyakit yang sering menyerang ternak unggas

seperti *newcastle disease* (ND), *avian influenza* (AI), *snot*, *gumboro* (IBD), *pullorum* dan *coccidiosis* (Subronto & Tjahajati, 2003), penanganannya masih bersifat kuratif seperti pemberian antibiotika dan vaksin. Namun, kendala penggunaan obat-obatan seperti antibiotika dan sejenisnya dalam mengatasi penyakit ternak dapat menyebabkan resistensi bakteri patogen dan menimbulkan residu pada karkas. Untuk memudahkan penanggulangan penyakit, cara yang lebih efektif dilakukan melalui upaya pencegahan (preventif).

Pencegahan penyakit pada ternak umumnya dengan pemberian suplemen pakan. Cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) merupakan salah satu bahan alam yang berpotensi dijadikan suplemen pakan. Beberapa jenis cacing tanah telah dilaporkan mengandung zat aktif yang bersifat anti bakteri patogen seperti *Eisinia foetida* (Lange *et al.*, 1999), *Theromyzon tessulatatum* (Tasiemski *et al.*, 2004), *Lumbricus rubellus* (Cho *et al.*, 1998) dan dapat menstimulasi sistem kekebalan (Liu *et al.*, 2004; Engelmann *et al.*, 2005). Cacing tanah jenis *Allolobophora rosea* juga telah dilaporkan mengandung senyawa anti bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif (Sumardi, 1998).

Selain memiliki daya hambat terhadap bakteri patogen, tepung cacing tanah juga memiliki kadar protein kasar yang tinggi sekitar 48,5% - 61,9% (Resnawati, 2002), kaya akan asam amino prolin sekitar 15% dari 62 asam amino (Cho *et al.*, 1998). Penggunaan tepung cacing tanah sebagai suplemen pakan diharapkan dapat meningkatkan kualitas pakan sekaligus untuk menghambat penyakit akibat infeksi bakteri patogen. Penelitian ini difokuskan untuk mengetahui daya hambat tepung cacing tanah terhadap aktivitas bakteri *E. coli* secara *in-vitro* dengan metode difusi sumur agar (agar well diffusion).

MATERI DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan adalah tepung cacing tanah dari spesies *Lumbricus rubellus*, kultur bakteri *E. Coli* (biakan murni), media *nutrient agar*, alkohol 70%, larutan DMSO (dimethyl sulfoxide), spiritus, kapas. Peralatan yang digunakan adalah corong *burner*, tabung reaksi, cawan petri, labu *Erlenmeyer*, *beacker glass*, pengaduk, *inoculating loop*, *micropipet*, bunsen dan jangka sorong.

Pembuatan tepung cacing tanah dilakukan dengan menggunakan metode Mihara *et al.*

(1991) yang dimodifikasi. Cacing tanah dibersihkan dari tanah dan kotoran lainnya yang menempel kemudian dimasukkan ke dalam ember, dicuci dengan air. Cacing yang telah bersih disimpan dalam kulkas (suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$) selama 12 jam. Cacing tanah kemudian dikeringkan dalam oven 50°C selama 4-6 jam selanjutnya dihaluskan dengan blender menjadi tepung cacing tanah (TCT).

Aktivitas daya hambat bahan yang mengandung TCT secara *in vitro* terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* diukur dengan menggunakan metode difusi melalui penggunaan sumur-sumur berdiameter 10 mm pada media tumbuh bakteri (Schlegel & Schmidt, 1994). Kemampuan penghambatan senyawa aktif dari cacing tanah terhadap pertumbuhan *E. coli* diindikasikan dengan terbentuknya zona jernih (Pelczar & Chan, 1998). Pengujian dilakukan di bawah keadaan yang terkontrol (steril).

Nutrient agar dibuat dengan komposisi 5 g pepton, 3 g *beef extract*, 15 g agar yang ditambah aquades sampai 1 liter (pH media 7). Biakan bakteri *E. coli* diinokulasikan ke dalam medium *nutrient agar*, kultur diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C . Sebanyak 20 ml media agar dalam cawan petri, diinokulasikan dengan 0,1 ml (10^7 - 10^8 cfu) bakteri *E. coli*. TCT yang diuji ditempatkan di atas permukaan media yang sudah diinkubasi. Taraf TCT pada perlakuan 0%, 25%, 50%, 75%, dan 100% (w/v) berturut-turut 0, 25, 50, 75 dan 100 mg dalam 100 ml medium DMSO.

Peubah yang diamati adalah diameter zona hambatan (dalam cm) pada sumur-sumur di media tumbuh bakteri. Pengamatan dilakukan selama lima hari. Data diameter hambat diuji secara statistik dengan sidik ragam (ANOVA) dalam rancangan acak kelompok (RAK) dan jika menunjukkan perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan. Hubungan taraf pemakaian TCT terhadap peubah yang diamati dianalisis menggunakan

uji ortogonal polinomial (Mattjik & Sumertajaya, 2002).

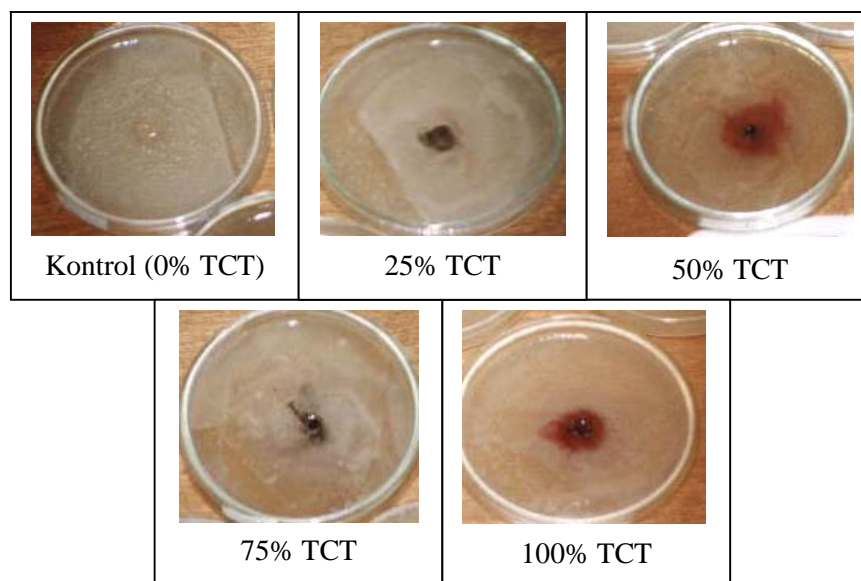
HASIL DAN PEMBAHASAN

Tepung cacing tanah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* terbukti dengan terbentuknya zona hambatan pada perlakuan 25%, 50%, 75%, 100% (w/v) jika dibandingkan dengan kontrol (0%). Secara visual, penghambatan pertumbuhan *E. coli* oleh tepung cacing tanah (TCT) dapat dilihat pada Gambar 1. Pada gambar tersebut dapat dilihat pada permukaan media terdapat lingkaran zona hambat tepung cacing tanah terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* yang diamati pada hari kedua. Pada perlakuan 0% TCT/kontrol permukaan media berwarna putih tanpa lingkaran zona hambat yang mengindikasikan tidak terdapatnya reaksi penghambatan terhadap *E. coli*.

Hasil penelitian penghambatan pertumbuhan *E. coli* selama 5 hari pengamatan tersebut disajikan pada Tabel 1. Berdasarkan data pengukuran diameter penghambatan,

pemberian tepung cacing tanah dapat menghambat perkembangan bakteri *E. coli*. Penambahan tepung cacing tanah dapat menghambat perkembangan bakteri *E. coli* sampai lima hari dengan model regresi kubik kecuali pada kontrol dengan model regresi linear (Gambar 2 & Tabel 2).

Pada pengamatan hari pertama terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antar perlakuan kecuali pada perlakuan penambahan TCT 50% dan 100% yang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Pada pengamatan hari kedua justru penambahan TCT 25% dan 100% yang tidak berbeda nyata. Pada hari ketiga ditemui bahwa penambahan TCT 0% tidak berbeda nyata dengan 100% TCT, penambahan TCT 25% juga tidak berbeda nyata dengan penambahan TCT 75%, tetapi penambahan 50% TCT mempunyai daya hambat nyata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Pada hari keempat dan kelima semua perlakuan tidak berbeda nyata. Tingginya nilai deviasi setelah pengamatan hari ketiga (P4) dan hari keempat (P0, P1, P2, P3) dikarenakan pada beberapa sampel tidak terbentuk zona hambat.



Gambar 1. Zona hambat penggunaan berbagai konsentrasi TCT terhadap pertumbuhan *E. coli*

Tabel 1. Pengukuran zona hambat (cm)

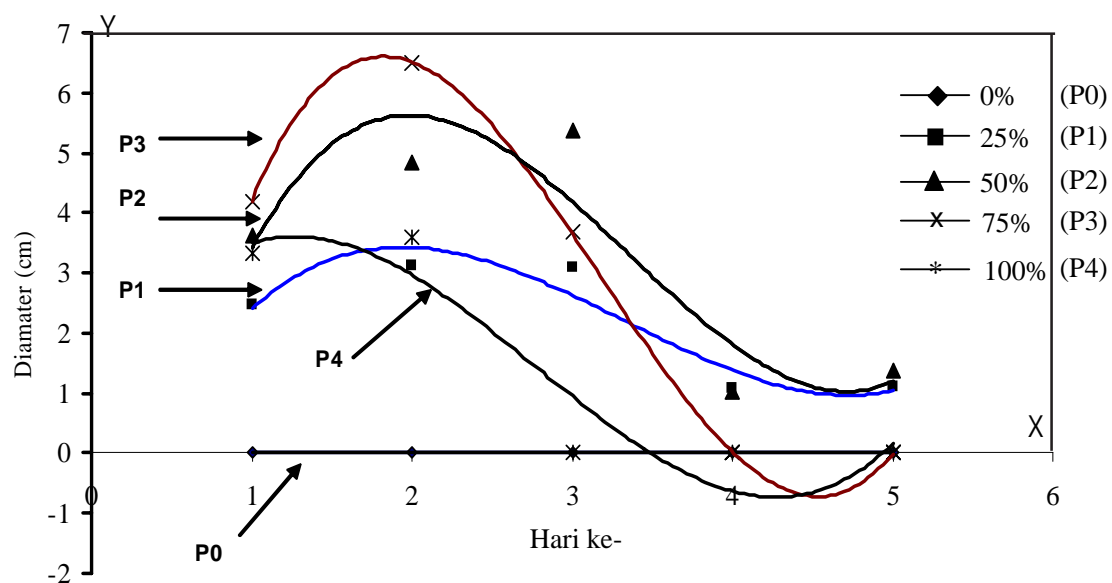
Hari ke-	Taraf penggunaan cacing tanah (%)				
	0 (P0)	25 (P1)	50 (P2)	75 (P3)	100 (P4)
1	0,00 ± 0,00	2,48 ± 0,43	3,62 ± 0,74	4,20 ± 0,28	3,34 ± 0,44
2	0,00 ± 0,00	3,12 ± 0,48	4,83 ± 0,79	6,49 ± 0,27	3,60 ± 0,63
3	0,00 ± 0,00	3,08 ± 1,32	5,38 ± 0,64	3,69 ± 2,83	0,01 ± 0,02
4	0,00 ± 0,00	1,08 ± 1,68	1,02 ± 1,61	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
5	0,00 ± 0,00	1,12 ± 1,56	1,39 ± 1,60	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Rataan	0,00 ^a	2,18 ^{bc}	3,24 ^c	2,88 ^{bc}	1,39 ^{ab}

Keterangan : superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05).

Berdasarkan Gambar 2 dapat dilihat pola pengaruh tepung cacing tanah dalam menghambat perkembangan bakteri *E. coli* pada lama pengamatan yang berbeda. Puncak daya hambat TCT terhadap *E. coli* dicapai pada hari kedua. Pada hari ketiga, pemberian TCT 50% menunjukkan daya hambat yang paling tinggi. Perlakuan TCT lebih dari 75% tidak menunjukkan aktivitas penghambatan mulai hari ketiga. Namun, konsentrasi TCT 25% dan

50% menunjukkan aktivitas sampai hari kelima pengamatan. Pada perlakuan tanpa penambahan TCT (kontrol) tidak tampak reaksi penghambatan yang ditunjukkan dengan kurva linear dengan nilai $y=0$ (P0).

Kemampuan tepung cacing tanah (*L. rubellus*) dalam menghambat aktivitas bakteri *E. coli* menunjukkan bahwa cacing tanah *L. rubellus* mengandung bioaktif yang bersifat anti bakteri. Diduga zat bioaktif tersebut adalah



Gambar 2. Hubungan lama pengamatan terhadap diameter penghambatan *E. coli*

Tabel 2. Persamaan regresi lama pengamatan terhadap diameter penghambatan *E. coli* pada setiap perlakuan taraf pemakaian TCT

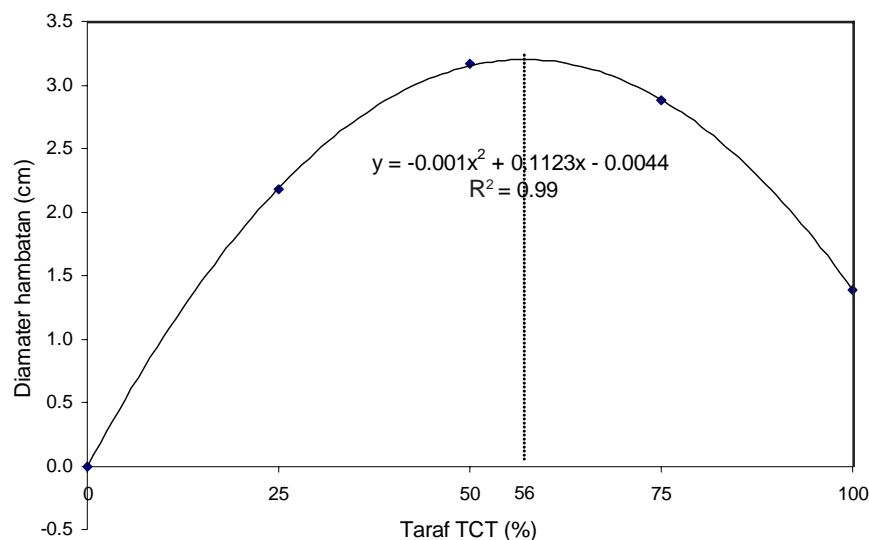
Kode perlakuan	Taraf TCT (%)	Persamaan regresi	Koefisien determinasi (R ²)
P0	0	$y = 0$	1,00
P1	25	$y = 0,23x^3 - 2,28x^2 + 6,26x - 1,809$	0,95
P2	50	$y = 0,45x^3 - 4,52x^2 + 12,61x - 5,128$	0,91
P3	75	$y = 0,73x^3 - 6,98x^2 + 18,12x - 7,683$	1,00
P4	100	$y = 0,32x^3 - 2,67x^2 + 5,24x + 0,610$	0,94

Keterangan: y = diameter hambat (cm), x = lama pengamatan/hari ke- (1, 2, 3, 4, 5).

lumbricin atau senyawa-senyawa peptida tertentu yang bersifat antibakteri. Liu *et al.* (2004) melaporkan bahwa cacing tanah seperti *Eisenia foetida* mengandung senyawa anti bakteri. Pada *E. foetida* dideteksi terdapat senyawa peptida yang berfungsi sebagai antibakteri karena mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen. Peptida tersebut diberi nama OEP3121 sesuai dengan kode urutan DNA hasil analisis bioaktif tersebut. Cho *et al.* (1998) menyatakan cacing *L. rubellus* mengandung bioaktif *lumbricin-1* yang dapat

menghambat bakteri gram positif maupun negatif (broad spectrum). Selain itu, golongan cacing tanah juga kaya senyawa peptida seperti coelomocytes (bagian dari sel darah putih) di dalamnya terdapat *lysozym* yang berperan dalam aktivitas fagositosis serta berfungsi untuk meningkatkan kekebalan (Engelmann *et al.*, 2005).

Hubungan antara taraf TCT dengan zona hambat terhadap *E. coli* mengikuti persamaan regresi kuadratik (Gambar 3). Berdasarkan persamaan regresi menunjukkan daya hambat

Gambar 3. Hubungan taraf pemakaian TCT terhadap diameter penghambatan *E. coli*

TCT semakin meningkat dengan penambahan TCT yang lebih tinggi dengan nilai optimal pemakaian TCT sebesar 56%. Namun, penambahan TCT melebihi 56% (P3 dan P4) menunjukkan penurunan daya hambat TCT terhadap *E. coli* sebesar 11% (P4) dan 57% (P5) dibandingkan P3.

Penurunan aktivitas ini dimungkinkan adanya sifat resistensi dari *E. coli* terhadap zat aktif dalam TCT pada taraf pemakaian lebih dari 50%. Selain itu, tingginya kadar TCT melebihi 50% dalam media DMSO diduga dapat menghambat penetrasi senyawa aktif antimikroba ke dalam sel bakteri. Hal ini berdampak pada menurunnya daya hambat TCT terhadap pertumbuhan *E. coli*. Dilaporkan oleh Engelmann *et al.* (2005) 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 patogen.

KESIMPULAN

Tepung cacing tanah (*L. rubellus*) pada taraf 25%, 50%, 75% dan 100% (w/v) dapat menghambat perkembangan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro* dengan penggunaan optimum pada taraf 50% (w/v).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Fakultas MIPA Universitas Lampung atas fasilitas laboratorium, kepada sdr. Sri Damayanti dan Widiati (Laboratorium Botani, Universitas Lampung), serta kepada sdr. Ema Damayanti (BPPT Kimia LIPI- Yogyakarta) atas partisipasinya dalam membantu kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Cho, J.H., C.B. Park, Y.G. Yoon & 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. [Abstr.].
- Engelmann, P., E.L. Cooper & P. Németh.** 2005. Anticipating innate immunity without a toll. *Mol. Immunol.* 42: 931-42.
- Lange, S., E. Kauschke, W. Mohrig & E.L. Cooper.** 1999. Biochemical characteristics of eiseniapore, a pore-forming protein in the coelomic fluid of earthworms. *Eur. J. Biochem.* 262: 547-556.
- Liu, Y.Q., Z.J. Sun., C. Wang, S.J. Li. & Y.Z. Liu.** 2004. Purification of novel antibacterial short peptide in earthworm. *Acta. Biochim. Biophys. Sinica.* 36: 297- 302.
- Mattjik, A.A. & M. Sumertajaya.** 2002. Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab. Jilid I. Edisi kedua. Institut Pertanian Bogor (IPB)-Press, Bogor.
- Mihara, H., H. Sumi, T. Yoneta, H. Mizumoto, R. Ikeda, M. Seiki & M. Maruyama.** 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Japan J. Physiol.* 41: 461-472.
- Pelczar, M. J & E.C.S. Chan.** 1998. Dasar-dasar Mikrobiologi II. Terjemahan: Hadioetomo, R.S., T. Imas, S.S. Tjitrosomo & S.L. Angka. Universitas Indonesia (UI)-Press, Jakarta.
- Resnawati, H.** 2002. Sebuah Wacana: Cacing Tanah sebagai Bahan Pakan Alternatif. <http://www.poultryindonesia.com> [21 Maret 2002].
- Schlegel, H.G. & K. Schmidt.** 1994. Mikrobiologi Umum. Terjemahan: R.M.T.Baskoro.

- Universitas Gadjah Mada (UGM)-Press, Yogyakarta.
- Schroeder, C.M., J. Meng, S. Zhao, C. DebRoy, J. Torcolini, C. Zhao, P. F. McDermott, D.D. Wagner, R.D. Walker & 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.
- Subronto & I. Tjahajati.** 2003. Ilmu Penyakit Ternak. Gadjah Mada University (UGM)-Press. Yogyakarta.
- Sumardi.** 1998. Deteksi dan karakteristik senyawa antibakteri hasil fermentasi; isolat mikroba dari dalam tubuh cacing tanah *Allolobophora rosea*. *J. Sains & Teknologi.* 4 : 233-240.
- Tasiemski, A., F. Vandenbulcke, G. Mitta, J. Lemoine, C. Lefebvre, P.E. Sautière & M. Salzet.** 2004. Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*. *J. Biol. Chem.* 279: 30973 – 30982.
- Yang, H., S. Chen, D.G. White, S. Zhao, P. McDermott, R. Walker & J. Meng.** 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3483–3489.