

**ANTAGONISM TEST OF PROBIOTICS BACTERIA ISOLATED FROM
BLACK TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*) AGAINST PATHOGENS
(*Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp and *Vibrio alginolyticus*)**

By

Nursit Wijayanto¹⁾, Feliatra²⁾, Syahril Nedi²⁾

nursitwijayanto@gmail.com

Abstract

Probiotics is one effective strategy in an effort to cope with the disease by pathogenic bacteria. The study aims to determine the level of pathogenic bacteria were isolated from the candidate probiotic intestinal tiger shrimp against pathogenic bacteria *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp and *V. alginolyticus*. Expected candidate probiotics can be used to combat the disease in fish and shrimp farming. Antagonism using disc diffusion test. Four isolates of candidate probiotic bacteria more dominant round, milky white color and yellow, smooth or scalloped edge. Four candidate probiotic bacteria can inhibit pathogenic bacteria *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp and *V. alginolyticus*. The highest inhibition zone on the candidate probiotics P1 against *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp of 11.7 mm and 11.1 mm. The highest inhibition zone on *V.alginolyticus* the candidate probiotic bacteria P2 of 11.4 mm.

Keywords: Probiotics, Tiger Shrimp, antagonists, *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp, *V. alginolyticus*.

1) Students of the Faculty of Fisheries and Marine Sciences, University of Riau

2) Lecturer Fakultas Perikanan And Marine Sciences, University of Riau

PENDAHULUAN

Masalah yang dihadapi pembudidaya ikan dan udang adalah semakin meluasnya penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Bakteri yang sering menyerang ikan atau udang budidaya adalah bakteri *Vibrio*, *Pseudomonas* dan *Aeromonas*. Bakteri *Vibrio* menyebabkan penyakit *vibriosis*, bakteri *Pseudomonas* sering menyerang ikan air tawar, bakteri *Aeromonas* menyebabkan penyakit *Motil Aeromonas Septicemia* (MAS). Bakteri yang menyerang ikan dan udang budidaya sering menyebabkan kematian maka perlu ditanggulangi. Penanggulangan penyakit menggunakan obat-obatan antibiotik dinilai kurang efektif karena dapat membawa dampak negatif terhadap daya tahan dan pertumbuhan udang (Kordi, 2004).

Penanggulangan penyakit menggunakan probiotik merupakan salah satu strategi yang efektif bersama aplikasi vaksin dan *immunostimulant* dalam menyehatkan ikan budidaya, sehingga mampu memproteksi diri terhadap serangan

penyakit. Probiotik memproteksi ikan budidaya melalui mekanisme menghasilkan senyawa kimia yang mempunyai aktivitas bakterisidal atau bakteriostatik terhadap populasi bakteri lain, khususnya bakteri yang bersifat patogen (Gomez *et al.*, 2007), seperti bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas sp* dan *Vibrio alginolyticus*.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui tingkat patogenitas bakteri calon probiotik yang diisolasi dari usus udang windu terhadap bakteri patogen *A. hydrophila*, *Pseudomonas sp* dan *V. alginolyticus*. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai bakteri calon probiotik yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan campuran pakan. Bakteri calon probiotik diharapkan dapat mempercepat pertumbuhan udang dan ikan, serta dapat mengatasi masalah penyakit yang dihadapi oleh para pembudidaya udang dan ikan.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Juli sampai Oktober 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Laut Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau.

Bahan-bahan yang digunakan adalah isolat bakteri calon probiotik yang diisolasi dari saluran pencernaan udang windu. Media yang digunakan adalah NA (*Nutrien Agar*), TSA (*Tryptic Soy Agar*), NB (*Nutrien Broth*), TSB (*Tryptic Soy Broth*). Isolat bakteri *Aeromonas hydrophila*, bakteri *Pseudomonas sp*, bakteri *Vibrio alginolyticus*, kristal violet, iodin, alkohol, H₂O₂ 3%, safranin, larutan pH 2, pH 4 dan akuades.

Peralatan yang digunakan adalah *autoclave*, inkubator, erlenmayer, cawan petri, jarum ose, tabung reaksi, lampu bunsen, *freezer*, aluminium foil, kertas padi, timbangan analitik, steril kabinet, vortex, mikropipet, kertas lebel, *object glass*, *cover glass*, kapas, mikroskop, kertas cakram(6 mm), jangka sorong, kamera dan alat tulis.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen, yaitu mengamati dan mengidentifikasi bakteri probiotik dan melakukan percobaan terhadap bakteri patogen (*A. hydrophila*, *Pseudomonas sp* dan *V. alginolyticus*).

Pemurnian bakteri calon probiotik dan bakteri patogen(*Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas sp* dan *Vibrio alginolyticus*).

Bakteri calon probiotik yang diisolasi dari saluran pencernaan udang windu dimurnikan dengan menggunakan metode gores (*streak method*). Media yang digunakan adalah media NA (*Nutrien Agar*). Penyeleksian bakteri calon probiotik menggunakan pH 2 dan pH 4 sebelum ditumbuhkan ke media cair NB (*Nutrien Broth*) lalu di vortex. Setelah itu dilakukan inkubasi bakteri selama 24-48 jam pada suhu 37°C.

Peremajaan bakteri patogen(*Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas sp* dan *Vibrio alginolyticus*) sebelumnya dilakukan dengan menggunakan media spesifik. Selanjutnya *A. hydrophila*, *Pseudomonas sp* dan *V. alginolyticus* dimurnikan menggunakan media TSA (*Tryptic Soy Agar*) sampai didapatkan satu koloni bakteri.

Identifikasi Calon Bakteri Probiotik

Identifikasi isolat bakteri calon probiotik dilakukan dengan mengamati secara visual bentuk, warna, elevasi dan tepian koloni bakteri. Identifikasi juga dilakukan dengan uji menggunakan senyawa kimia yaitu pewarnaan Gram, motilitas dan uji katalase.

Uji Antagonisme Dengan Metode Difusi Cakram

Metode cakram Kirby-Baer adalah cara yang paling mudah untuk mendapatkan antibiotika dengan cara menginokulasi plat agar dengan biakan dan membiarkan antibiotika berdifusi media agar. Cakram yang telah mengandung antibiotika diletakkan dipermukaan plat agar yang mengandung organisme yang akan diuji (Harmita, 2006).

Uji aktivitas bakteri calon probiotik terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp dan *Vibrio alginolyticus* dengan cara Kirby-Baer. Langkahnya sebagai berikut: suspensi bakteri yang telah diinkubasi dimasukkan secara aseptik ke dalam cawan petri sebanyak 1 ml, kemudian ditambahkan media NA 15 ml, yang bersuhu lebih kurang 40°C dan selanjutnya dihomogenkan untuk memastikan bakteri terdistribusi merata dan dibiarkan memadat. Di atas medium yang berisi bakteri dimasukkan kertas saring berdiameter 6 mm (kertas cakram) yang telah dicelupkan masing-masing larutan uji dan dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri Probiotik

Bakteri probiotik merupakan bakteri yang bersifat menguntungkan. Bakteri probiotik memiliki bentuk yang berbeda-beda antara satu dengan yang lainnya. Hasil pengamatan morfologi dan biokimia yang dilakukan, bakteri calon probiotik memiliki ciri-ciri pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengamatan Morfologi dan Biokimia Koloni Bakteri Calon Probiotik

No.	Karakteristik probiotik	Probiotik 1	Probiotik 2	Probiotik 3	Probiotik 4
1	Bentuk koloni	berbenang-benang	bundar	bundar	tidak beraturan dan menyebar
2	Tepian	berlekuk	Licin	licin	berlekuk
3	Warna	putih susu	putih kekuningan	putih susu	putih susu
4	Elevasi	timbul	timbul	cembung	Timbul
5	Katalase	positif	positif	positif	Positif
6	Motilitas	inmotil	inmotil	inmotil	Inmotil
7	Gram	positif	positif	positif	Positif

Berdasarkan Tabel 1. bakteri calon probiotik yang diamati berbentuk: berbenang-benang, bundar, serta tidak beraturan dan menyebar. Tepian : berlekuk dan licin. Warna: putih susu dan putih kekuningan. Elevasi : timbul dan cembung. Katalase: positif. Motilitas : inmotil. Gram positif.

Hasil pengamatan terhadap bakteri calon probiotik menunjukkan bahwa bakteri calon probiotik yang digunakan memiliki ciri-ciri yang berbeda satu dengan yang lainnya. Empat bakteri probiotik yang dilakukan uji pewarnaan Gram menunjukkan hasil uji positif (Gram +). Artinya bakteri probiotik tersebut memiliki dinding yang tipis dan menyerap warna violet. Bakteri Gram positif adalah bakteri yang dinding selnya menyerap warna violet dan memiliki membran plasma tunggal yang dikelilingi lapisan peptidoglikan yang tebal. Kandungan lipidnya rendah, menghambat warna basa, kebutuhan nutrisi kompleks.

Hasil uji motilitas bakteri empat bakteri kandidat probiotik menunjukkan bakteri bersifat inmotil. Bakteri yang bersifat inmotil menandakan bahwa bakteri tersebut tidak memiliki flagella sebagai alat pergerakan. Hal ini sesuai dengan uji yang dilakukan oleh (Sari, 2012) isolat probiotik yang uji bersifat negatif pada uji motilitas. Uji katalase empat bakteri calon probiotik menunjukkan hasil positif atau katalase (+) artinya bakteri probiotik tersebut menghasilkan enzim katalase. Hasil uji katalase menunjukkan bahwa semua isolat bakteri probiotik merupakan katalase positif, yang berarti memiliki enzim katalase (Feliatra *et al*, 2011). Djide dan Wahyudin (2008) menjelaskan bahwa reaksi katalase menunjukkan hasil positif bila terbentuk gelembung udara yang mengindikasikan terbentuknya gas O₂ dan hasil negatif jika tidak menunjukkan adanya gelembung gas.

Bakteri calon probiotik yang digunakan dalam uji antagonisme sebelumnya dimasukkan ke dalam pH 4 dan pH 2. Bakteri calon probiotik (P1) dan (P2) merupakan bakteri yang dimasukkan ke pH 4, sedangkan bakteri calon probiotik (P3) dan (P4) dimasukkan ke dalam pH 2. Tujuannya agar didapatkan isolat yang benar-benar bakteri kandidat probiotik. Menurut (Quenzedo *et al.*, 2013), probiotik harus mampu menguasai saluran pencernaan dan meningkatkan kesehatan suhu inangnya melalui aktivitas metabolik. Secara khusus, probiotik harus dapat bertahan pada kondisi asam lambung dan resisten pada garam tingkat tinggi dengan sekitar pH 2 dan pH 7 sebagai kontrol.

Menurut (Kanmani *et al*, 2010), salah satu karakteristik bakteri probiotik terhadap yaitu memiliki ketahanan yang tinggi terhadap asam. Bakteri yang mendekati genus ini memiliki ciri-ciri morfologi yaitu Gram positif, bentuk sel bulat, batang dan motil. Bentuk koloni bundar, tepian koloni berombak, elevasi koloni cembung dan warna koloni kuning atau krem.

Zona Hambat Bakteri Calon Probiotik Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp dan *Vibrio alginolyticus*.

Zona hambat yang dibentuk oleh bakteri calon probiotik terhadap bakteri patogen *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp dan *V. alginolyticus* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Zona Hambat Bakteri Calon Probiotik Terhadap Bakteri *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp dan *V. alginolyticus*.

No	Larutan uji	Ukuran Zona Hambat(mm)			Rata-rata Zona Hambat(mm)		
		<i>Aeromonas Hydrophila</i>	<i>Pseudomonas</i> sp	<i>Vibrioal ginolyticus</i>	Ah	P(sp)	Va
1	P1	10,2	11,3	11,3	11,7	11,1	11,1
		14,0	10,4	11,5			
		10,8	11,5	10,6			
2	P2	10,0	11,0	11,3	9,9	10,3	11,4
		10,3	9,2	11,5			
		9,5	10,7	11,3			
3	P3	10,4	10,0	9,8	9,2	10,3	10,3
		8,9	10,6	9,7			
		8,2	10,3	11,5			
4	P4	9,5	12,0	10,4	9,7	11	10,9
		9,5	10,4	10,5			
		10,0	10,6	11,7			
5	Amoxan	14,4	17,0	10,8	14,3	15,9	10,9
		14,0	13,6	11,1			
		14,6	17,1	10,8			
6	Negatif	0	0	0	0	0	0

Keterangan:

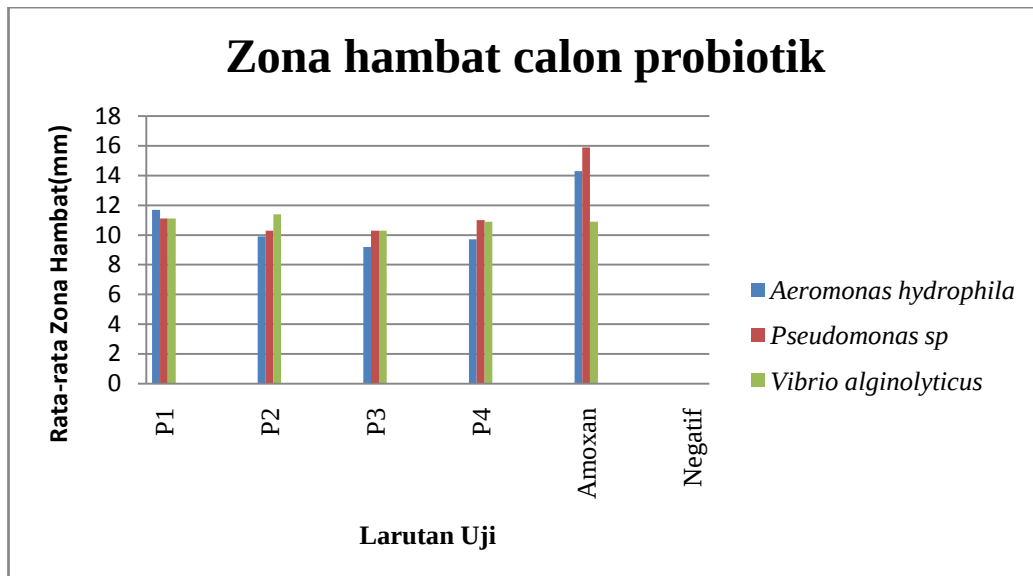
Amoxan : Kontrol Positif
Negatif : Kontrol Negatif
P1,P2,P3,P4 : Probiotik

Ah : *A. hydrophila*
P(sp) : *Pseudomonas* sp
Va : *V. alginolyticus*

Berdasarkan Tabel 1. setiap bakteri calon probiotik memiliki kemampuan yang berbeda dalam menghambat atau menekan pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp dan *Vibrio alginolyticus*.

Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa bakteri probiotik berperan aktif dalam menghambat bakteri patogen. Pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) sebanyak 20 isolat BAL yang bersifat antagonisme terhadap bakteri *V. alginolyticus* (Nursyirwani *et al.*, 2011). Bakteri probiotik *Bacillus cereus* merupakan bakteri probiotik yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen, *Vibrio* sp dan *Aeromonas* sp (Feliatra *et al.*, 2012). Empat isolat bakteri calon probiotik yang terdapat dari usus ikan bandeng dapat menghambat bakteri pertumbuhan *V. alginolyticus* (Wardani *et al.*, 2013).

Rata-rata zona hambat bakteri calon probiotik dapat dilihat pada Gambar 1. Berikut merupakan gambar zona hambat yang bakteri calon probiotik terhadap bakteri *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp dan *V. alginolyticus*.



Gambar 3. Zona hambat bakteri calon probiotik terhadap bakteri *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp dan *V. alginolyticus*.

Berdasarkan Gambar 3. Rata-rata besar zona hambat bakteri calon probiotik terhadap bakteri *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp dan *V. alginolyticus* secara berturut-turut adalah {(11,7 mm), (11,1 mm), (11,1 mm)} (P1), {(9,9 mm), (10,3 mm), (11,4 mm)} (P2), {(9,2 mm), (10,3 mm), (10,3 mm)} (P3), {(9,7 mm), (11,0 mm), (10,9 mm)} (P4). Rata-rata zona hambat antibiotik (amoxan) terhadap tiga bakteri patogen secara berturut-turut adalah {(14,3 mm), (15,9mm), (10,9 mm)}.

Zona rata-rata hasil pengukuran dilakukan uji statistik dengan menggunakan uji ANOVA. Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa rata-rata zona hambat yang terbesar terlihat pada calon probiotik (P1) dengan bakteri patogen *A. hydrophila*. Hasil pengukuran uji antagonisme menunjukkan bahwa calon probiotik memiliki kemampuan hambat yang berbeda terhadap setiap bakteri patogen (*A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp dan *V. alginolyticus*). Davis dan stout 1971 menyatakan bahwa bila memiliki daerah hambatan 20 mm atau lebih berarti memiliki kekuatan antibakteri sangat kuat, bila daerah hambatan berkisar 10-20 mm berarti kuat, bila daerah hambatannya 10-5 mm berarti sedang dan bila daerah hambatannya 5 mm atau kurang dari 5 mm maka aktivitas antibakteri tergolong lemah (Davis dan Stout, 1971).

Bakteri probiotik yang di uji dengan bakteri patogen membentuk hambatan, artinya bakteri probiotik tersebut menghasilkan produk antibiotik, bakteriosin, ataupun asam organik tertentu. Menurut (Verschuere *et al*, 2000) populasi mikroba dapat melepaskan substansi kimia yang mempunyai kemampuan bakteisidal atau bakteristatis yang dapat mempengaruhi populasi mikroba lain. Secara umum kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri lain

dikarenakan satu atau kombinasi beberapa faktor seperti : produksi antibiotik, bakteriosin, siderphores, lisosom, protease dan hidrogen peroksida atau mempengaruhi pH media dengan menghasilkan asam organik tertentu. Agen antibakteri seperti asam laktat dan bakteriosin yang dimiliki bakteri probiotik dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Fauziah *et al.*, 2012). Hal ini dikarenakan agen antibakteri mampu menurunkan pH menjadi rendah sehingga bakteri patogen sulit bertahan hidup (Tambekar and Bhutada, 2010).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa, 4 bakteri kandidat (calon) probiotik yang diuji dengan bakteri patogen (*Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp dan *Vibrio alginolyticus*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Daya hambat tertinggi pada isolat bakteri calon probiotik (P1) dengan bakteri patogen *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. Besarnya diameter hambatan secara berturut-turut adalah 11,7 mm dan 11,1 mm. Daya hambat tertinggi pada bakteri patogen *V. alginolyticus* ditunjukkan isolat bakteri calon probiotik (P2) dengan diameter hambatannya 11,4 mm.

Saran

Pada penelitian ini kepadatan bakteri tidak dihitung. Pada penelitian selanjutnya, disarankan menghitung kepadatan bakteri yang akan diuji. Hasil uji yang didapat menyatakan bakteri calon probiotik tersebut, dikatakan layak atau tidak digunakan sebagai tambahan pakan dalam budidaya ikan dan udang, sekaligus sebagai pencegah penyakit pada ikan dan udang yang dibudidayakan.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada bapak Prof.Dr.Ir. Feliatra,DEA selaku Pembimbing I dan kepada bapak Dr.Ir.Syahril Nedi,M.Si selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan masukan dan arahan kepada penulis dalam melakukan penelitian. Tidak lupa terima kasih untuk rekan-rekan yang telah membantu dan memberikan motivasi untuk penulis.

DAFTAR PUSTAKA

- Davis and stout.1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. *Journal of Microbiology*.
- Djide, M.N. dan Wahyuddin, E. 2008. Isolasi Bakteri Asam Laktat dan Air Susu Ibu dan Potensinya dalam Penurunan Kadar Kolesterol Secara In Vitro. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. Vol 12 (3).
- Fauziah, P.N., Nurhajati, J., dan Chrysanti. 2012. Penghambatan adhesi berbagai strain *Klebsiella pneumoniae* oleh *Lactobacillus bulgaricus* dalam soyghurt secara in vitro pada HEp-2 cell lines dengan berbagai proses perlakuan infeksi [skripsi]. Bandung: Universitas Padjadjaran. hlm. 66-75.

- Feliatra, Nugroho, F., Sazali, T. dan Yuslima, S. 2011. Molecular Characteristics of *Vibrio* sp Causing Giant Tiger Prawn (*Penaeus monodon*) Disease By DNA 16s Sequencing. *Agricultural Technology*: 7 No 3 (679-694).
- Feliatra, Fitriana, Y. dan Nursyirwani. 2012. Antagonis Bakteri Probiotik Yang Diisolasi Dari Usus Dan Lambung Ikan Kerapu Bebek (*Cromileptes Altivelis*) Terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal Perikanan dan Kelautan* 17,1 :16-25 .
- Gómez R. Geovanny , Balcázar José Luis, & MA Shen. 2007. Probiotics Control Agents in Aquaculture. *J. Ocean University of China*. 6: 76-79.
- Harmita. 2006. *Analisis Kuantitatif Bahan Baku dan Sediaan Farmasi*. Jakarta: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Kordi, M.G.H., 2004. *Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan*. PT. Rineka Cipta Bina Adiaksara: Jakarta. Hal: 26 – 46, 116-117.
- Nursyirwani, W. Asmara, A.E.T.H. Wahyuni dan Triyanto. 2011. isolasi bakteri asam laktat dari usus ikan kerapu macan (*Epinephelus Fuscoguttatus*) dan potensinya sebagai antivibrio. *Ilmu Kelautan. Indonesia Journal of Marine Sciences*, 16(2):70-77.
- Quezedo, Sergio-Munos., Empar Chenol., Jose Maria Vieites., Salvador Genoves. 2013. *Isolation, Identification and chasracterisation of three novel probiotik strains (Lactobacillus paracasei CNCM I-4034, Bifidobacterium breve CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infant*. *British Journal Nutrition*
- Sari, R. 2012. Karakterisasi Bakteri Probiotik yang Berasal dari Saluran Pencernaan Ayam Pedaging. Skripsi. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Tambekar, D.H., and Bhutada, S.A. 2010. An evaluation of probiotic potential of Lactobacillus sp. From milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. *Recent Research Science and Technology*, 2(10):82–88.
- Verscheure, L., Rombaut, G., Sorgeloos, B., and Vestraete, W. 2000. Probiotik Bacteria as Biological Control Agents In Aquaculture. *Microbial and Mol.Biol. rev.* 64: 655-671
- Wardani, B.A., R. Sari dan Sarjito. 2013. Inventarisasi bakteri yang berpotensi sebagai probiotik dari usus ikan bandeng (*Chanos chanos*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2(1): 75-86.