

The Antagonists Test of Probiotic Bacteria Isolated from Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon fabricus*) Against Pathogens *Pseudomonas* sp, *Aeromonas hidrophyla*, *Vibrio alginolyticus*

By

**Ranap Junani Sari¹, Feliatra², Dessy Yoswaty²
Ranapjunani_sari@yahoo.com**

Abstract

Probiotic bacteria are beneficial microbes that are beneficial to improve the microbial balance in the digestive tract. The purpose of research to test the antimicrobial activity of probiotic bacteria in inhibiting the growth of pathogenic bacteria *Pseudomonas* sp, *Aeromonas hidrophyla*, and *Vibrio alginolyticus*. The method used in penilitian is a survey method, ie dengam observe and identify probiotic bacteria isolated from the gastrointestinal tract tiger shrimp (*Penaeus monodon fabricus*).

The results showed that that the greatest inhibition zone strains of probiotic bacteria contained in the code R10 is able to inhibit the activity of pathogenic bacteria *P. stutzeri* with a large zone of inhibition was 9.93 mm, the largest zone of inhibition of bacterial pathogens *A. hydrophila* is a probiotic bacterial strain with code R8 with a large zone of inhibition is 9:46 mm, and most large inhibition zones of bacterial pathogens are present in *V. alginolyticus* strains of probiotic bacteria with the code R10 with a large zone of inhibition was 8.90 mm.

Keywords : *Probiotic Bacteri, Black Tiger Shrimp, Against Pathogens*

¹Student of Fishery and Marine Science Faculty, Riau University

²Lecturer of Fishery and Marine Science Faculty, Riau University

PENDAHULUAN

Udang windu (*Penaeus monodon fabricius*) merupakan salah satu jenis udang yang menarik dan menguntungkan untuk dipelihara. Budidaya udang windu di tambak sangat menggiurkan keuntungannya, tetapi dibalik itu ternyata budidaya udang windu banyak menyimpan permasalahan yang diakibatkan oleh penyakit yang menyerang udang windu. Kehadiran jenis bakteri patogen seperti *Vibrio* sp, *Aeromonas* sp, *Pseudomonas* sp akan menyebabkan penyakit pada ikan budidaya, sehingga perlu diantisipasi untuk pencegahannya (Feliatra *et al.*, 2012).

Untuk menjaga kualitas terhadap serangan penyakit pada ikan budidaya diperlukan pengendalian dan penanganan terhadap bakteri patogen. Salah satu pengendalian bakteri patogen adalah mempertemukan dengan bakteri antagonisnya. Bakteri antagonis yang digunakan sebagai agen pengendalian hayati dimasukkan dalam istilah probiotik. Senyawa-senyawa racun yang dihasilkan pada metabolisme bakteri probiotik seperti asam laktat, hidrogen peroksida, bakteriosin yang bersifat antimikroba dan antibiotik mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen (Yulinery *et al.*, 2006). Prinsip dasar kerja probiotik adalah pemanfaatan kemampuan mikroba dalam meningkatkan penyerapan pada saluran pencernaan ikan (Yulvizar, 2014).

Untuk menjaga kualitas terhadap serangan penyakit pada ikan budidaya diperlukan pengendalian dan penanganan terhadap bakteri patogen. Salah satu pengendalian bakteri patogen adalah mempertemukan dengan bakteri antagonisnya. Bakteri antagonis yang digunakan sebagai agen pengendalian hayati dimasukkan dalam istilah probiotik.

Berdasarkan hal tersebut, penulis tertarik untuk melakukan penelitian mengenai uji antagonisme bakteri probiotik yang diisolasi dari udang windu dengan bakteri patogen *Pseudomonas stutzeri*, *A. hydrophila*, dan *Vibrio alginolitycus*.

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan adalah udang windu (*Penaeus monodon fabricus*) untuk mencari calon kandidat bakteri probiotik. Bakteri *Pseudomonas stutzeri* sebagai bakteri patogen diisolasi dari ikan lele. Bahan yang digunakan pada saat penelitian adalah media *Nutrient Agar* (NA) untuk media bakteri probiotik dan *Pseudomonas Aeromonas Selective* agar (GSP) untuk media bakteri *Pseudomonas stutzeri*. Bahan yang digunakan pada uji antagonis yaitu media Trypton Soya Agar (TSA), alkohol, aquades, spiritus, larutan fisiologis pH 2, larutan fisiologis pH 4, amoxan (antibiotik), zat kimia untuk pewarnaan gram (kristal violet, safranin, larutan *Iodine* dan *immersion oil*), hydrogen peroksida, larutan 1% *tetra methyl-p-penylenediamine*.

Pengambilan sampel dan isolasi bakteri Bakteri probiotik diisolasi pada organ pencernaan yaitu lambung dan usus ikan kembung segar sebanyak 100 g sampel. Ikan dibedah untuk diambil bagian lambung dan usus, lalu dimasukkan ke dalam larutan fisiologis NaCl 0,9% (Feliatra *et al.*, 2004). Selanjutnya, lambung dan usus dihancurkan atau dihaluskan dengan menggunakan mortar porselen. Sampel yang telah dihaluskan, kemudian dilakukan seri pengenceran kemudian dilakukan pengenceran dari pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-6} dan diambil 1 ml kemudian diinjeksikan ke permukaan media Nutrien Agar (NA) yang telah beku dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 30°C . Setelah diinkubasi selama 24 jam diamati pertumbuhan koloni pada permukaan media NA. Ambil masing-masing koloni yang berbeda sebanyak satu ose, lalu dimasukkan kedalam pH 2, dan pH 4 dan dihomogenkan agar koloni merata pada pH dan didiamkan selama kurang lebih 2 jam, bakteri dimasukkan dalam larutan pH 2 dan pH 4 adalah agar yang dapat tumbuh hanya bakteri probiotik saja, karena bakteri probiotik bersifat asam. Setelah 2 jam bakteri yang dimasukkan dalam larutan pH distrike pada media agar NA dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam isolat diamati

dan dilihat pertumbuhan calon kandidat bakteri probiotik. Setelah didapatkan calon kandidat bakteri probiotik yang murni, dilakukan peremajaan bakteri.

Bakteri patogen *Pseudomonas* sp diisolasi dari ikan lele sebanyak 1 ekor yang berukuran 15-25 cm, bakteri diambil dari ginjal dan luka borok yang terdapat pada kulit ikan dengan menggunakan jarum ose dan langsung distrike kepermukaan media GSP dengan tujuan hanya bakteri *Pseudomonas* sp karena media GSP bukan merupakan media selektif *Pseudomonas* sp melainkan juga *Aeromonas* sp. Setelah itu isolate bakteri patogen tersebut diinkubasi selama 24 jam.

Pengamatan yang dilakukan yaitu secara langsung diidentifikasi secara morfologi seperti pengamatan bentuk sel, tipe pergandengan sel, warna, koloni, ukuran koloni dan tipe koloni, pewarnaan gram, katalase, oksidase, methyl red. Uji morfologi maupun biokimia berdasarkan Alcamo (1983) dan Lay (1994).

Media NA yang sudah steril, didiamkan sampai kisaran suhu 50-60°C, kemudian secara aseptis dicampurkan kultur bakteri *P.stutzeri* dengan perbandingan 1:3 (bakteri: media). Media yang sudah bercampur bakteri *Pseudomonas* sp dituang kedalam cawan petri steril masing-masing 10 mL, dan dibiarkan memadat. Media padat yang bercampur bakteri *Pseudomonas* sp, dibuat sumuran dengan menggunakan besi pelubang berdiameter 6 mm. Hasil inkubasi akan menunjukkan adanya koloni bakteri uji dan zona bening disekitar sumuran, yang menandakan adanya efek penghambatan larutan uji terhadap bakteri uji. Zona bening yang ada merupakan zona hambat, dapat diukur dengan menggunakan jangka sorong.

Uji aktivitas antibakteri *Pseudomonas* sp dengan cara Kirby Bauer dilakukan dengan cara berikut: suspensi bakteri *Pseudomonas* sp yang telah diinkubasi dimasukkan secara aseptis kedalam cawan petri sebanyak 1 ml, kemudian ditambahkan TSA (Trypton Soya Agar) sebanyak 15ml yang bersuhu 40°C dan selanjutnya dihomogenkan untuk memastikan bakteri terdistribusi secara merata dan dibiarkan memadat. Diatas medium yang berisi bakteri

Pseudomonas sp dimasukkan kertas cakram berdiameter 0,5 mm yang telah dicelupkan masing-masing oleh bakteri probiotik dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰ C.

Pengujian aktivitas antibakteri dinyatakan positif apabila disekitar kertas cakram terdapat zona bening atau zona hambat yang berbentuk melingkari kertas. Diameter zona hambat yang terukur adalah hasil rata-rata dari dua kali pengukuran.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil pengamatan morfologi calon kandidat bakteri probiotik didominasi oleh warna putih susu dan memiliki bentuk dan tepian yang berbeda-beda. Ciri-ciri morfologi dari koloni kandidat bakteri probiotik dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pengamatan Morfologi Calon Kandidat Bakteri Probiotik

No	pH 2				
	Kode	Bentuk	Tepian	Elevasi	Warna
1	R2	Bundar	Licin	Timbul	Putih susu
2	R8	Tidak beraturan	Berlekuk	Datar	Putih susu

Hasil pengamatan morfologi kandidat probiotik pada pH 4 memiliki bentuk, tepian, dan elevasi yang berbeda, namun warna dari masing-masing koloni adalah sama. Hasil pengamatan dapat di lihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Morfologi Calon Kandidat Bakteri Probiotik

No	pH 4				
	Kode	Bentuk	Tepian	Elevasi	Warna
1	R2	Tidak beraturan	Berlekuk	Datar	Putih susu
2	R8	Bundar	Licin	Timbul	Putih susu
3	R9	Bundar	Berlekuk	Timbul	Putih susu
4	R10	Tidak beraturan	Bercabang	Timbul	Putih susu

Setelah diperoleh calon kandidat bakteri probiotik, kemudian dilakukan uji antagonis terhadap 3 (tiga) bakteri patogen yaitu, *Pseudomonas stutzeri*, *Aeromonas hydrophyla*, dan *Vibrio alginolyticus*. Dalam uji antagonis yang dilakukan ada 2 (dua) metode, yaitu metode cakram dan metode sumuran

Uji antagonis terhadap 3 (tiga) bakteri patogen yaitu, *Pseudomonas stutzeri*, *Aeromonas hydrophyla*, dan *Vibrio alginolyticus* pada pH 2 disajikan pada tabel 3.

Tabel 3. Uji Daya Hambat Bakteri Patogen Pada pH 2

Bakteri	Strain	Pengulangan			Rata-Rata	Kontrol (+)	Kontrol (-)
		1	2	3			
P. Stutzeri	R2	0	0	0	0	5.3	0
	R8	0	0	0	0	6.7	0
A. hydrophyla	R2	0	0	0	0	4.6	0
	R8	0	0	0	0	4.9	0
I. alginolyticus	R2	0	0	0	0	3.21	0
	R8	0	0	0	0	3.13	0

Berdasarkan Tabel 7 dapat dilihat bahwa bakteri patogen *P. stutzeri* tidak menunjukkan adanya zona hambat. Zona hambat terlihat pada kontrol positif, pada R8 kontrol positifnya lebih besar dibandingkan R2. Pada uji daya hambat terhadap bakteri patogen *A. hydrophila* tidak menunjukkan adanya zona hambat. Zona hambat terlihat pada kontrol positif, pada R8 kontrol positifnya lebih besar dibandingkan R2. Pada uji daya hambat terhadap bakteri patogen *V. alginolyticus* tidak menunjukkan adanya zona hambat. Zona hambat terlihat pada kontrol positif, pada R2 kontrol positifnya lebih besar dibandingkan R8.

Hasil uji daya hambat terhadap bakteri patogen *P. stutzeri* menunjukkan adanya zona bening pada setiap isolat R2, R8, R9, dan R10. Zona hambat paling besar terlihat pada strain bakteri probiotik R10 yaitu 9.93 mm dan zona hambat paling kecil terlihat pada strain bakteri probiotik R9 yaitu 7.36 mm, dan pada kontrol positif juga terdapat zona hambat dengan rata-rata zona hambat adalah 11.18 mm. Pada kontrol negatif tidak terdapat zona hambat yang mampu menekan bakteri patogen hal ini membuktikan bahwa media cair TSB tersebut layak digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri patogen.

Gambar 1. Hasil Uji Hambat Bakteri Patogen *P. stutzeri*

Hal ini juga didukung berdasarkan penelitian (Alexander, 2011) bahwa kandidat probiotik yang diisolasi dari udang windu (*P.monodon fabricus*) mampu menghasilkan senyawa bakteriosin yang mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen, udang windu mempunyai beberapa macam bakteri di dalam saluran pencernaan sebagai agen probiotik yang memiliki daya hambat terhadap perkembangan *V. harveyi*, yakni bakteri dari genus *Bacillus*, *Lactobacillus* dan *Staphylococcus*.

Gambar 2. Uji Daya Hambat *A. hydrophila*

Pada uji daya hambat terhadap bakteri patogen *A.Hydrophila* menunjukkan adanya zona bening pada setiap isolat R2, R8, R9, dan R10. Zona hambat paling besar terlihat pada strain R8 yaitu 8.6 mm dan zona hambt paling rendah terlihat pada strain R2 yaitu 7.23. Pada kontrol positif terdapat zona hambat juga, terlihat lebih besar pada strain R8, tidak terdapat zona hambat pada kontrol positif yang merupakan medai cair TSB sehingga kontrol positif baik digunakan untuk pertumbuhan bakteri probiotik.

Gambar 4. Hasil Uji Daya Hambat *V.alginolyticus*

Pada uji daya hambat terhadap bakteri patogen *V. alginolyticus* menunjukkan adanya zona bening pada isolat R8, R9, dan R10 dan pada 2 strain tidak terlihat adanya zona bening. Zona hambat paling besar terlihat pada strain R10 yaitu 8.9 mm dan paling rendah terlihat pada strain R9, dan pada kontrol positif amoxan terdapat zona hambat paling besar yaitu pada strain R8 dengan besar zona hambat yaitu 10.8 mm. Dan tidak terdapat zona hambat pada kontrol negatif yang merupakan media cair TSB sehingga kontrol positif baik digunakan untuk pertumbuhan bakteri probiotik.

Uji antagonis dengan metode sumuran terhadap bakteri patogen yaitu, *Pseudomonas stutzeri*, *Aeromonas* pada pH 2 disajikan pada tabel 4.

Tabel 4. Uji Daya Hambat Metode Sumuran *P.stutzeri*

Bakteri	Strain	Pengulangan			Rata-rata	Kontrol (+)	Kontrol (-)
		1	2	3			
P. stutzeri	R2	0	0	0	0	11.23	0
	R8	0	0	0	0	11.9	0
	R9	0	0	0	0	11.5	0
	R10	0	0	0	0	11.1	0

(0) Tidak terdapat zona bening

Pada uji antagonis dengan menggunakan metode sumuran tidak terlihat adanya zona hambat pada strain bakteri patogen terhadap setiap bakteri patogen. Zona bening hanya terlihat pada kontrol positif, zona bening yang paling besar di perhatikan oleh strain 2, dan paling rendah diperlihatkan oleh strain 10. Uji antagonis dengan menggunakan metode sumuran dilakukan untuk perbandingan dengan metode cakram. Dan terlihat bahwa metode cakram lebih baik dari pada metode sumuran.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa bakteri kandidat probiotik mampu menghambat zona pertumbuhan bakteri patogen spesies *Pseudomonas stutzeri* namun tidak terlalu efektifitas dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* dan juga *Vibrio alginolyticus*. Strain bakteri probiotik yang paling berpotensi dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen *P. stutzeri* adalah strain bakteri probiotik dengan kode R10 yaitu dengan zona hambat adalah 11.18 mm dan zona hambat paling kecil adalah R8 dengan zona hambat 10.34 mm,

DAFTAR PUSTAKA

Feliatra E dan E. Suryadi. 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. Jurnal Natur Indonesia 6 (2): 75-80

Setyabudi D., Imas. S. S., dan Yeni H. 2010. Sistem Pakar Diagnosa Penyakit Udang Windu (*Peneus monodon*) Menggunakan Logika Fuzzy. Bogor Jawa Barat. Jurnal Ilmiah Komputer. Vol 14 No 1. Hal 10-15

Yulinery, T., E. Yulianto, N. Nurhidayat, N. 2006. Uji fisiologis probiotik *Lactobacillus* sp. Mar 8 yang telah dienkapsulasi dengan menggunakan Spray Dryer untuk menurunkan kolesterol. Biodiversitas, 7(2): 118-122.

Yulizar C., Dewiysnti I, dan Defira C N. 2014. Seleksi Bakteri Berpotensi Probiotik Dari Ikan (*Cyprinus carpio*) Indegenous Jantho Berdasarkan Aktivitas Antibakteri Secara In Vitro. Banda Aceh. Jurnal Teknologi dan Pertanian Indonesia. Vol 6 No 1. Hal 19-24