

EFEKTIVITAS BAKTERI PROBIOTIK DARI UDANG GALAH (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man) TERHADAP BAKTERI PATOGEN *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas stutzeri* DAN *Vibrio alginolyticus*

By

Desi Anggreni¹⁾, Feliatra²⁾, Nursyirwani²⁾

desianggrenipku@yahoo.co.id

Abstract

Probiotic bacteria capable of producing substances like antibiotic sandin dispensable for being able to suppress the growth of pathogenic bacteria into disease and parasites in aquaculture. The research purpose of this study to find probiotic isolates were able to control the disease in aquaculture. The candidate probiotic bacteria isolated from prawn (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man) by the method of scratch on TSA and NA media. Anti-bacterial activity using media discs on Zobell and TSA. 4 isolates were found which consisted of coccus, white and orange colonies. All isolates had inhibitory effect on the growth of pathogenic bacteria. The highest sensitivity test is indicated by P4 DUG isolates of *A. hydrophilla* at 13,30, 13,20 and 14,10 of *P. stutzeri* in *V. alginolyticus*

Keyword : Probiotic, Effectiveness, Tiger Prawn.

¹⁾ Student at Faculty of fisheries and marine sciences, Riau University.

²⁾ Lecture at Faculty of fisheries and marine sciences, Riau University.

PENDAHULUAN

Pengembangan usaha budidaya laut saat masih memegang peranan penting dalam pengembangan sektor perikanan dan kelautan. Indikator keberhasilan usaha budidaya perikanan adalah efisiensi pakan dan kesehatan ikan, pengendalian parasit dan penyakit sangat penting, karena akan tumbuh pada kondisi lingkungan yang buruk.

Jenis bakteri patogen yang biasanya menyerang ikan budidaya adalah seperti *Vibrio* sp, *Aeromonas* sp dan *Pseudomonas* sp. Penyakit yang dihasilkan bakteri patogen genus *Vibrio* sp, terutama spesies *Vibrio alginolyticus* biasa kita sebut dengan istilah vibriosis, sedangkan penyakit yang ditimbulkan oleh spesies *Aeromonas hydrophilla* dikenal dengan istilah MAS (*Motil Aeromonas Septicemia*) atau penyakit bercak merah pada ikan.

Vibriosis dan parasit lainnya yang menyerang ikan, biasanya akan mudah diatasi dengan antibiotik, akan tetapi penggunaan antibiotik sudah dilarang karena mempunyai dampak negatif pada lingkungan dan terjadinya bioakumulasi residu antibiotik pada daging

hewan laut yang dibudidayakan (Isnansetyo *et al.*, 2009). Hal itu maka perlu dicari alternatif lain untuk penanganan penyakit dan parasit dan tidak merusak lingkungan. Salah satu alternatifnya adalah dengan penggunaan probiotik.

Probiotik adalah mikroba hidup yang menguntungkan pada makhluk hidup, yang bermanfaat untuk memperbaiki keseimbangan mikroba di dalam saluran pencernaan dan memberikan pengaruh positif terhadap fisiologi dan kesehatan inangnya (Afrianto dan Lifiawati, 2005). Bakteri yang dapat memproduksi substansi yang mirip antibiotik dan mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen dan dapat digunakan untuk mengurangi penggunaan antibiotik dalam budidaya ikan yang tidak meninggalkan residu yang berbahaya.

Mekanisme kerja probiotik adalah 1) menghasilkan asam, 2) menghasilkan bahan antimikroba (bakteriosin), 3) dapat berkembang biak dalam saluran pencernaan dan berkompetisi dengan bakteri patogen dan 4) mikroba probiotik berkompetisi dengan mikroba patogen untuk berikatan dengan reseptor yang sama (Lopez, 2000; Harish dan Varghese, 2006).

Pada saat memilih mikroorganisme yang akan dijadikan probiotik, persyaratan yang harus dimiliki oleh mikroba probiotik antara lain adalah 1) tidak bersifat patogen atau mengganggu inang, tidak bersifat patogen bagi konsumen (manusia dan hewan lainnya), 2) tidak mengganggu keseimbangan ekosistem setempat, 3) mikroba tersebut hendaklah dapat dan mudah dipelihara dan diperbanyak, 4) dapat hidup dan bertahan serta berkembang biak di dalam usus ikan, 5) dapat dipelihara dalam media yang memungkinkan untuk diintroduksi ke dalam usus ikan dan 6) dapat hidup dan berkembang di dalam air wadah pemeliharaan ikan atau udang (Feliatra. 2004)

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei –September 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Laut Jurusan Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau metode yang digunakan adalah metode survei dengan mengamati bakteri probiotik yang diambil dari pencernaan udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man) yang diperoleh dari Pasar Dupa Pekanbaru.

Bahan- bahan yang digunakan pada saat penelitian ini adalah media Nutrient agar (NA), dan Trypton Soya Agar (TSA), Thiosulphate Citrate Bile Salt (TCBS), Trypton Soya Broth (TSB), media Zobell agar 7 % dengan komposisi Polypepton (Oxoid), yeast extract (Oxoid), bahan kimia yang digunakan alcohol, agar, aquades, spiritus. Ph 2 dan ph 4, sedangkan zat kimia yang digunakan adalah untuk uji pewarnaan Gram dan uji biokimia adalah Kristal violet, Safranin larutan iodine.

Alat-alat yang digunakan adalah tabung reaksi, pipet transfer. Mikroskop, objek glass, cover glass, hot plate, glass spreader, batang pengaduk incubator, autoclave, Erlenmeyer, jarum ose, cawan petri, glass beaker. Timbangan analitik, lampu Bunsen, kertas label, jangka sorong dan laminar.

Prosedur penelitian, dimulai dari penanganan sampel udang, yaitu dengan dibedah secara aseptis dan diambil organ pencernaannya, lalu dimasukkan ke dalam larutan

fisiologis pada pH 2 dan pH 4. Lalu dilanjutkan dengan penanaman pada bakteri pada media kultur TSA dan NA dan dilakukan pengulangan beberapa kali agar koloni benar-benar murni, lalu disimpan pada suhu 4⁰ C untuk pengujian selanjutnya. Selanjutnya dilakukan isolasi pada bakteri patogen *Vibrio alginolyticus*, bakteri ini diperoleh dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, Jawa Tengah, pemurnian dilakukan dengan menanam bakteri pada media TCBS dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 31⁰ C dan disimpan untuk uji daya hambat, bakteri *Aeromonas hydrophila* diperoleh dan telah diuji pada Laboratorium Uji Stasiun Karantina Penanggulangan Parasit Penyakit Ikan Kelas 1 Pekanbaru, biakan diperbanyak pada media NA dan dibuat stok pada agar miring, agar biakan bertahan lebih lama. Isolat patogen *Pseudomonas stutzeri* diisolasi dari ikan lele (*Clarias fariasus*), diperbanyak pada media TSA dan diidentifikasi di Laboratorium Uji Stasiun Karantina Penanggulangan Parasit Penyakit Ikan Kelas 1 Pekanbaru.

Tahapan selanjutnya adalah identifikasi bakteri calon probiotik yaitu dengan pengamatan morfologi koloni meliputi bentuk, ukuran dan warna koloni. Uji morfologi maupun biokimia berdasarkan Alcamo (1983) dan Lay (1994), yaitu dimulai dari pewarnaan Gram, tujuannya untuk mengetahui apakah isolat mampu menyerap warna Kristal violet atau tidak. Dan jika isolat mampu menyerap warna kristal violet dan sel berwarna ungu maka isolat tergolong bakteri gram positif dan jika berwarna kemerahan maka isolat tergolong bakteri gram negatif. Selanjutnya dilakukan uji katalase untuk melihat gelembung gas dan uji motilitas untuk mengetahui apakah isolat bersifat motil atau tidak.

Uji aktivitas bakteri calon probiotik terhadap bakteri patogen dilakukan dengan metode cakram (*paperdisc*) pada *double layer agar* (Davidson dan Parish dalam Nursyirwani, 2013) yaitu dengan cara satu ose koloni calon probiotik diisolasi pada media cair TSB dan diinkubasi selama 24 jam. Sementara itu TSA pada cawan petri disiapkan dan dibiarkan mengeras, dan media Zobell juga disiapkan untuk dalam tabung reaksi untuk media tumbuh *V. alginolyticus* dan TSA untuk media tumbuh *A. hydrophila* dan *P. stutzeri*. Satu ose bakteri patogen dimasukkan ke dalam medium tersebut dan divortex hingga homogen, lalu dimasukkan ke dalam TSA yang telah mengeras tadi dan biarkan hingga memadat. Sebanyak 50 µl suspensi probiotik yang telah diinkubasi dalam TSB selama 24 jam dan diteteskan pada kertas cakram, dengan menggunakan mikropipet selama 2 jam, lalu diletakkan dalam yang berisi media Zobell dan TSA dengan pipet steril. Cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 29⁰ C, lalu terbentuk zona penghambat yaitu zona bening disekitar kertas cakram diamati dan diukur dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan millimeter dan uji ini dilakukan tiga kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Hasil

Dari hasil penelitian yang dilakukan bahwa isolasi bakteri yang didapatkan dari usus dan lambung udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man) tumbuh dan berkembang pada media TSA maupun NA dengan pH 2 dan pH 4 yang merupakan kisaran pH untuk memaksimalkan pertumbuhan bakteri probiotik dan telah dilakukan pemurnian.

Isolat calon probiotik diidentifikasi berdasarkan pengamatan morfologi dan uji biokimia (Tabel 1). Dari hasil pengamatan morfologi dan uji biokimia yang didapatkan

masing-masing koloni yang tumbuh pada media hampir seragam, yaitu warna, bentuk koloni, elevasi, ukuran dan tepian.

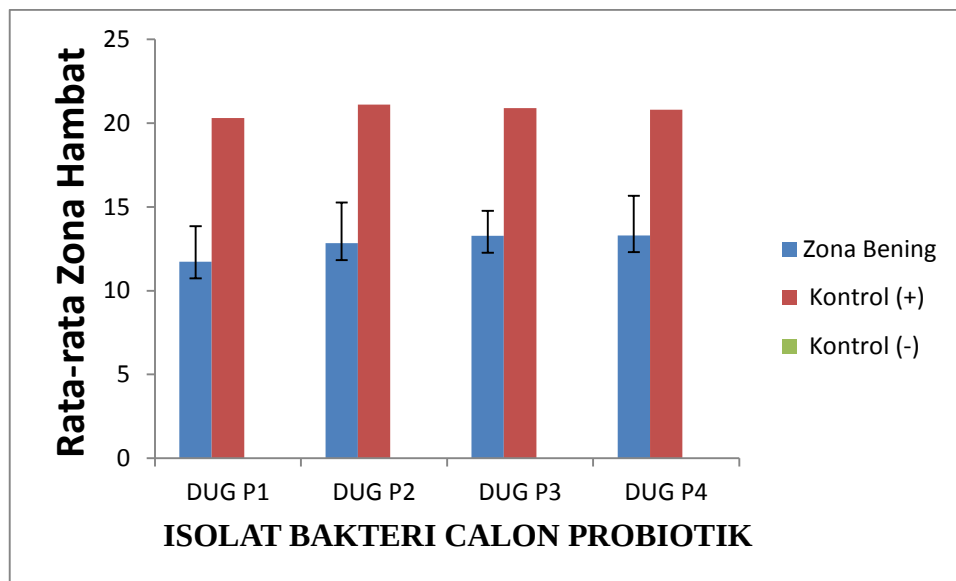
Tabel 1 : Pengamatan Morfologi Isolat Bakteri Kandidat Probiotik

No	Karakteristik Probiotik	DUG P1	DUG P1	DUG P3	DUG P4
1	Bentuk Koloni	Tak beraturan	Bundar	Tak beraturan	Bundar
2	Tepian	Wol	Keriput	Wol	Keriput
3	Elevasi	Cembung	Cekung	Cembung	Cekung
4	Warna	Putih susu	Putih kekuningan	Putih susu	Putih susu
5	Gram	+	+	+	+
6	Katalase	-	-	-	-
7	Motilitas	-	-	-	-
8	Indol	+	+	+	+

Setelah didapatkan data bahwa isolat tersebut mampu tumbuh pada pH rendah, maka untuk memastikan bakteri tersebut merupakan isolat bakteri probiotik yang menghasilkan asam laktat, maka dilakukan uji selanjutnya yaitu uji daya hambat, untuk mengetahui sampai sejauh mana kandidat probiotik tersebut mampu menghambat bakteri patogen seperti *A. hydrophila*, *P. stutzeri* dan *V.alginolyticus* secara *in vitro*. Setelah dilakukan uji maka didapatkan bahwa kandidat probiotik tersebut mampu menghambat bakteri patogen tersebut, dengan diameter zona hambat (*clear zone*) yang berbeda-beda.

Daya hambat isolat calon probiotik terhadap patogen *A. hydrophilla* berkisar dari yang terendah 11.8 mm sampai yang tertinggi 13.33 mm (Gambar 1), terhadap bakteri patogen *P. stutzeri* berkisar dari yang terendah 12.0 mm sampai yang tertinggi 13.2 mm (Gambar 2) dan terhadap *V. alginolyticus* berkisar dari 11.73 mm sampai 13.33 mm (Gambar 3).

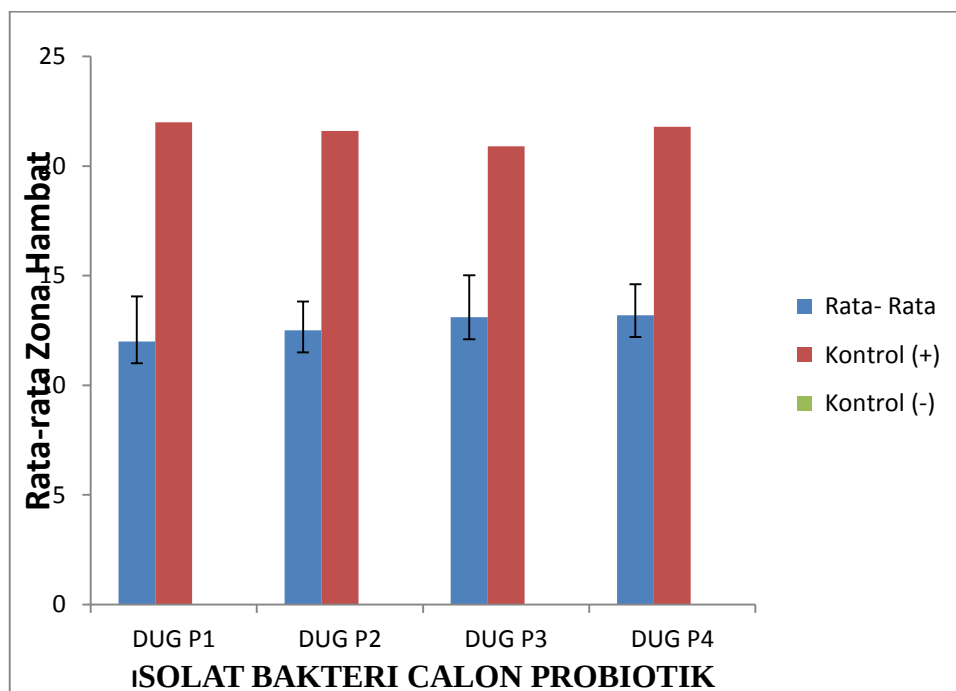
Pada Gambar 3 dapat dilihat bahwa isolat calon probiotik menunjukkan kemampuan tertinggi dalam menghambat pertumbuhan *A. hydrophilla* adalah isolat DUG P4



Gambar 1 : Hasil daya hambat probiotik terhadap *A.hydrophila*

Pada gambar diatas didapatkan hasil uji bakteri probiotik terhadap bakteri patogen yang diuji secara in vitro. Semua isolat menunjukkan mampu menghambat bakteri patogen *A. hydrophila*, *P. stutzeri* dan *V. alginolyticus*. Dari gambar dapat dilihat rata-rata total daya hambat berkisar dari 11,8 - 13,33 mm dengan standar deviasi berkisar dari 0,26 -1,31.

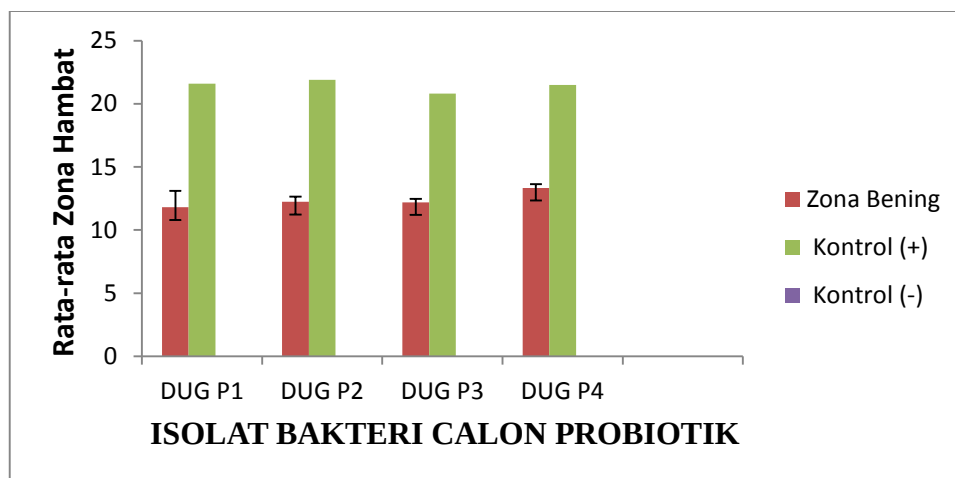
Uji probiotik terhadap bakteri patogen *P. stutzeri* pada Gambar 4 yaitu isolat calon probiotik menunjukkan kemampuan tertinggi adalah pada isolat DUG P4



Gambar 2 : Histogram daya hambat terhadap *P. stutzeri*

Sejauh efektivitas calon bakteri probiotik dalam menghambat bakteri patogen *P. stutzeri* dapat kita amati pada gambar diatas. Kemampuan bakteri calon probiotik dalam menghambat bakteri patogebn tersebut berkisar dari 12,0 – 13,3 mm dengan standart deviasi berkisar antara 1,32 – 2,05. Pada uji terhadap patogen *P. stutzeri* kontrol positif memiliki nilai daya hambat yang tinggi yaitu berkisar 20,9 – 22,0 mm dan kontrol negatif mempunyai nilai daya hambat 0, karena tidak ada aktivitas bakteri calon probiotik distu dan bakteri patogen paling banyak tumbuh pada daerah kontrol negatif tersebut.

Sejauh mana bakteri probiotik dalam menghambat bakteri patogen paling ganas terhadap budidaya *V. alginolyticus* juga disajikan dalam histogram dibawah ini :



Gambar 3: Histogram hambat terhadap *V. alginolyticus*

Bagaimana aktivitas bakteri calon probiotik terhadap patogen *V. alginolyticus* dapat kita amati pada gambar diatas. Daya hambat calon probiotik terhadap bakteri patogen *V. alginolyticus* berkisar dari 20,8 – 21,9 mm. Dengan standart deviasi berkisar 0, 26 – 1,31. Pada uji ini juga didapatkan bahwa tidak ada isolat yang mempunyai kemampuan menghambat sebesar daya hambat kontrol positif (*chlorophenicol*) yaitu berkisar 20,3 – 21,1 mm. Pada uji ini juga kontrol negatif yang digunakan adalah media TSA juga tidak memiliki aktivitas daya hambat pada media.

b. Pembahasan

Uji tantang dengan menggunakan *paperdisc method* (metode kertas cakram), dan hasil hasil positif hal ini dibuktikan dengan adanya zona hambatan disekeliling kertas cakram .Hal ini sesuai dengan pendapat Pratiwi (2008) bahwa aktivitas antibakteri dinyatakan positif apabila terbentuk zona hambat berupa zona bening disekitar kertas cakram.

Dari ke-4 isolat diameter zona hambat yang paling tertinggi dari keempat isolat dijumpai pada probiotik isolat DUG P4 yaitu sebesar 13.30 mm pada *A.hydrophila*, 13.20 mm pada *P.stutzeri* dan pada *V.alginolyticus* sebesar 14.10 mm. Akan tetapi dari ke-4 isolat dari zona hambat yang diperoleh dan belum didapatkan satu isolat pun yang mampu melewati zona hambat *chloromphenicol* yaitu sebesar 22.10, yang digunakan sebagai kontrol positif pada penelitian ini. Dari kriteria yang disebutkan diatas tersebut maka zona hambat yang terbentuk oleh kontrol positif (*chloromphenicol*) termasuk ke dalam golongan antibakteri yang memiliki aktivitas sangat kuat. Mekanisme penghambatannya yaitu dengan cara memblokir ikatan asam amino pada rantai peptide yang mulai timbul pada uni 50S ribosom dengan mengganggu kerja *peptidyl transferase*. Akibatnya proses pertumbuhan dari mikroorganisme terganggu (Brook, 2005).

Zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram merupakan zona aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen. Terbentuknya zona bening dikarenakan adanya penghambatan senyawa antimikroba terhadap sel-sel mikroba, secara umum mekanisme kerja dari suatu senyawa antimikroba dapat dilakukan dengan cara mengganggu atau merusak penyusun dinding sel, bereaksi dengan membran sel yang menyebabkan peningkatan permeabilitas seluler, inaktivasi enzim-enzim esensial dan destruksi atau inaktivasi fungsi dan materi genetik (Sari *et al.*,2013).

Dari uji pewarnaan Gram yang dilakukan ke- 4 isolat mampu menyerap warna ungu pada pewarnaan kristal violet dan tidak luntur ketika dicuci dengan air, dan hal ini membuktikan bahwa ke-4 isolat tersebut merupakan bakteri dengan Gram positif Savadago *et al.* (2006) menjelaskan bahwa bakteri asam laktat terdiri dari sekelompok bakteri Gram positif, tidak membentuk spora serta berbentuk batang dan bulat yang bersifat non motil. Bakteri Gram positif mampu mengikat sangat kuat dan pori-pori tidak mudah membesar dikarenakan lapisan bakteri tidak mengandung banyak lipid sehingga pada saat pencucian dengan alkohol kristal violet tidak larut.

Ciri dari bakteri Gram positif adalah mampu mempertahankan zat kristal violet sewaktu proses pewarnaan Gram, sehingga akan terlihat seperti bewarna biru atau ungu ketika dilihat dibawah mikroskop. Bakteri Gram positif pada umumnya hanya mempunyai membran plasma tunggal yang dikelilingi dinding sel tebal berupa peptidoglikan. Sekitar 90 persen dari dinding sel tersebut tersusun atas peptidoglikan sedangkan sisanya berupa molekul lain bernama asam teikhoat.

Hasil uji menunjukkan bahwa ke-4 isolat bakteri probiotik menunjukkan tidak mampu menghasilkan enzim katalase ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung udara (O_2) pada saat ditetesi H_2O_2 Djide dan Sartini (2008) mengemukakan bahwa dari hasil uji biokimia berupa uji katalase terhadap bakteri asam laktat menunjukkan hasil yang negatif.

Mekanisme enzim katalase memecah H_2O_2 yaitu saat melakukan respirasi, bakteri menghasilkan berbagai macam komponen salah satunya H_2O_2 . Bakteri yang memiliki kemampuan memecah H_2O_2 dengan enzim katalase maka segera membentuk suatu sistem pertahanan dari toksik H_2O_2 yang dihasilkannya sendiri. Bakteri katalase positif akan memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 dimana parameter yang menunjukkan adanya aktivitas katalase tersebut adalah adanya gelembung-gelembung oksigen. Bakteri katalase negatif tidak menghasilkan gelembung-gelembung. Hal ini berarti H_2O_2 yang diberikan tidak dipecah oleh bakteri katalase negatif sehingga tidak menghasilkan oksigen. Bakteri katalase negatif tidak memiliki enzim katalase yang mengurai H_2O_2 , indol positif dan tidak terjadi motilitas.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bahwa semua isolat bersifat tidak motil, karena bakteri tersebut tidak memiliki alat gerak (flagel) Savadago *et al.* (2006) menjelaskan bahwa bakteri asam laktat terdiri dari sekelompok bakteri Gram positif, tidak membentuk spora serta berbentuk batang dan bulat yang bersifat non motil. Menurut Cullimore (2000) bakteri asam laktat baik yang bersifat Gram Positif maupun yang bersifat bipolar (Gram positif dan Gram negatif) memiliki sifat non-motil.

I. KESIMPULAN

Isolat bakteri yang diperoleh dari saluran pencernaan udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man) yang berpotensi sebagai probiotik diduga sementara genus

praasumtif *Lactobacillus* dan genus *Bacillus* tapi hal dapat dibuktikan apabila melakukan uji lanjutan apakah bakteri tersebut benar-benar pada genus tersebut. Genus ini memiliki ketahanan pada pH 2 dan pH 4, yang merupakan indikator utama bakteri probiotik dan telah terbukti menguntungkan dan sebagai flora pada saluran pencernaan udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man). Isolat Bakteri calon probiotik dengan daya hambat paling tinggi yaitu pada bakteri patogen *Aeromonas hydrophilla* dan paling rendah pada *Vibrio alginolyticus*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Prof. Dr. Ir. Feliatra DEA selaku pembimbing I dan kepada Ibu Dr.Ir. Nursyirwani, M.Sc selaku pembimbing II yang banyak memberikan masukan dan arahan kepada penulis dalam penelitian, serta rekan rekan yang telah membantu dan memberikan motivasi kepada penulis.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto E dan Liviawaty E. 2005. *Pakan Ikan*. Kanisius, Yogyakarta
- Brooks G. F., Janet S. Butel. dan Stephen A. Morse. 2005. Mikrobiologi Kedokteran. Salemba Medika. Jakarta.
- Davidson, P.M. and M.E. Parish. 1989. Methods for testing the effecacy of food antimicrobials. *Food Technology*-January 1989: 148-155
- Djide, M. N., dan Sartini, 2008, Isolasi, Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Kol *Brassica oleracea* L. dan Potensinya sebagai Antagonis *Vibrio harveyi* In Vitro. *Torani*, Vol.18 (3) : 211-216.
- Feliatra E dan Suryadi E. 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. *Jurnal Natur Indonesia* 6 (2): 75-80
- Harish, K. And Varghese, T. 2006. Probiotics in Humans - Evidence Based Review. *Calicutmedical Journal* 4 (4) : e3.
- Isnansetyo, A.,I. Istiqomah, Muhtadi, S. Sinansari, R.K. Hernawan, Triyanto and J. Widada. 2009. A potential bacterial biocontrol agent, strain S2V2 against pathogenic marine *Vibrio* in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 1103-1113

- Lopez, J. 2000. Probiotics In Animal Nutrition. *Asian-Aust J Anim Sci.*13. special issue:12-26.
- 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. Indonesian Journal of Marine Sciences*, 16(2): 70-77.
- Pratiwi., S.T. 2008. Mikrobiologi Farmasi. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Sari, Yuni Nurisva Maya, Sumyarti S, dan Jamsari. 2013. Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi DNA Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Berpotensi Sebagai Antimikroba dari Fermentasi Markisa Kuning (*Passiflora edulis var.flavicarfa*). *Jurnal Kimia Unand* (ISSN No. 2303-3401), Volume 2 Nomor 2.
- Savadago, Cheik, O. A. T., Imael, B. H. dan Alfred, T. S., 2006, Bacteriocins and Lactid Acid Bacteria – A Minireview, *African Journal Biotechnology*, Vol. 5 (9), pp. 678 – 683.