

POTENSI ANTAGONISTIK BAKTERI *Lactobacillus plantarum* TERHADAP BAKTERI PATOGEN *Aeromonas salmonicida* SECARA *IN VITRO*

THE POTENTIAL ANTAGONISTIC BACTERIUM *Lactobacillus plantarum* AGAINST BACTERIAL PATHOGENS *Aeromonas salmonicida* BY *IN VITRO*

Yunifar Amad, Rahayu Kusdarwati dan Gunanti Mahasri

Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo - Surabaya, 60115 Telp. 031-5911451

Abstract

Problems were often experienced by fish farmers is bacterial pathogen *Aeromonas salmonicida* which causes furunculosis disease in fish. The way to control the growth of this pathogenic bacteria was using antagonist bacteria of *Lactobacillus plantarum*. Growth of *L. plantarum* may inhibit contamination of pathogenic bacterial because of its ability to produce bacteriocins, produce lactic, moreover that these bacteria can produce hydrogen peroxide which can function as an antibacterial. This research aimed to provide information on the use of bacterial antagonists *L. plantarum* in inhibiting the growth of pathogenic bacteria *A. salmonicida* on *In Vitro*.

This research was conducted on October 2012 until January 2013 at dry laboratory in Fisheries and Marine Faculty of Airlangga University Surabaya. This research used Completely Randomized Design (CRD) with five treatments and four replications. Bacteria *L. plantarum* with 0 concentration for control (A), 10^6 (B), 10^7 (C), 10^8 (D), 10^9 (E) tested challenge by paper disc method with 10^6 concentrate of pathogenic bacteria *A. salmonicida* *in vitro*.

The results showed that *L. plantarum* with a concentration of 10^9 CFU/ml (E) was a treatment that produced average of obstacle on the distribution of *A. salmonicida* amounted to 12,375 mm. Then the treatment with a concentration of 10^8 CFU/ml (D) with the average of obstacle 8,95 mm. While treatment with a concentration of 10^7 CFU/ml (C) and 10^6 CFU/ml (B) was having average of obstacle 6.8 mm and 6 mm was not significantly different from the control (A) which had an average 6 mm obstacle. So it could be concluded that bacteria *L. plantarum* had antagonistic potential against bacterial pathogens *A. salmonicida* which indicated by the obstacle produced by *L. plantarum* on growth of pathogenic bacteria *A. salmonicida*.

Keywords : *Lactobacillus plantarum*, *Aeromonas salmonicida*, paper disc test, obstacle

Pendahuluan

Permasalahan yang sering dialami petani budidaya ikan adalah penyakit. Salah satunya adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen *Aeromonas salmonicida*. Bakteri *A. salmonicida* merupakan salah satu patogen obligat penyebab utama penyakit *furunculosis* pada ikan. Bakteri ini menginfeksi bagian luar dari tubuh ikan, misalnya kulit dan insang. Namun, selain di permukaan tubuh, *A. salmonicida* juga menyerang saluran pencernaan ikan. Penyakit akibat bakteri ini sangat mudah menular pada ikan lain yang berada disekitar ikan yang terkena penyakit. (Isoken et al., 2012)

Cara yang sering dilakukan untuk mengontrol pertumbuhan bakteri patogen ialah dengan menggunakan antibiotik, namun penggunaan antibiotik ternyata dapat menimbulkan efek samping yaitu dapat menjadikan bakteri patogen menjadi resisten.

Oleh karena itu perlu dilakukan pencarian metode lain yang aman bagi biota dan lingkungannya. Salah satunya adalah dengan memanfaatkan sifat antagonisme antar bakteri atau antar komunitas bakteri. (Shickney, 2000)

Bakteri antagonis merupakan mikroorganisme non patogen yang jika dikonsumsi akan memberikan pengaruh yang positif terhadap fisiologi dan kesehatan inangnya. Suatu bakteri dapat dikatakan bakteri probiotik apabila bersifat non patogen, menghasilkan asam dengan cepat, tahan terhadap garam empedu, mampu menempel pada epitel dinding saluran pencernaan, serta mampu memproduksi substansi antimikroba termasuk asam organik, hidrogen peroksida dan bakteriosin. Bakteri asam laktat dari jenis *Lactobacillus* banyak yang termasuk sebagai bakteri yang memiliki sifat antagonisme terhadap bakteri patogen sehingga menarik untuk diteliti lebih lanjut sebagai agen

pengendali bakteri patogen. (McNaught dan MacFie, 2000)

Lactobacillus plantarum mampu merombak senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan hasil akhirnya yaitu asam laktat. Asam laktat dapat menghasilkan pH yang rendah pada substrat sehingga menimbulkan suasana asam. Pertumbuhan *L. plantarum* dapat menghambat kontaminasi dari bakteri patogen dan penghasil racun karena kemampuannya untuk menghasilkan asam laktat dan menurunkan pH substrat, selain itu bakteri asam laktat dapat menghasilkan hidrogen peroksida yang dapat berfungsi sebagai antibakteri (Suriawiria, 1983)

Pemanfaatan bakteri antagonis sebagai agen pengendali bakteri patogen akan semakin penting dari segi ekosistem akuakultur, mengurangi dan bahkan menghilangkan penggunaan antibiotik sehingga tercipta sistem budidaya yang ramah lingkungan. Manfaat dari penelitian adalah untuk memberikan informasi tentang pemanfaatan bakteri antagonis *Lactobacillus plantarum* sebagai agen pengendali hayati dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Aeromonas salmonicida* secara *In Vitro*

Metodologi

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium kering Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga Surabaya pada bulan Oktober 2012 hingga Januari 2013.

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain oven, *centifuge*, cawan petri, tabung reaksi, jarum *ose*, bunsen, pinset, *autoclave*, *laminar air flow*, pipet, spatle, *refrigerator*.

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan yang digunakan untuk penelitian berupa isolat murni bakteri *Aeromonas salmonicida* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml dan *Lactobacillus plantarum* dengan konsentrasi 10^1 CFU/ml, berurutan hingga 10^9 CFU/ml. Media tumbuh yang digunakan adalah *de Man Rogosa Sharpe Agar* dan *Broth* (MRSA dan MRSB) sesuai dengan petunjuk Ogunbanwo *et al.* (2003). *Tryptic Soy Agar* (TSA), akuades steril, kertas cakram.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu rancangan yang digunakan untuk percobaan yang mempunyai media percobaan yang seragam, sehingga banyak digunakan untuk percobaan di laboratorium. Penelitian ini menggunakan RAL dengan lima perlakuan dan empat ulangan dengan acuan dari hasil penelitian penadahuluan, yaitu :

Perlakuan A : Kertas cakram diletakkan pada isolat *A. salmonicida* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml (kontrol).

Perlakuan B : *L. plantarum* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml diuji tantang dengan *A. salmonicida* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml.

Perlakuan C : *L. plantarum* dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml diuji tantang dengan *A. salmonicida* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml.

Perlakuan D : *L. plantarum* dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml diuji tantang dengan *A. salmonicida* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml.

Perlakuan E : *L. plantarum* dengan konsentrasi 10^9 CFU/ml diuji tantang dengan *A. salmonicida* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml.

Sterilisasi alat dan bahan dalam penelitian ini menggunakan *Autoclave* (autoklaf). *Autoclave* adalah alat untuk mensterilkan berbagai macam alat dan bahan yang digunakan dalam mikrobiologi menggunakan uap air panas bertekanan. Tekanan yang digunakan pada umumnya 2 atm dan dengan suhu 121°C (250°F). Lama sterilisasi yang dilakukan 15 menit untuk 121°C . Cara penggunaannya adalah pertama, sebelum melakukan sterilisasi, banyaknya air dalam autoklaf di periksa terlebih dahulu. Jika air kurang dari batas yang ditentukan, maka dapat ditambah air sampai batas tersebut. Lalu alat dan bahan dimasukkan. Kemudian autoklaf ditutup dengan rapat agar tidak ada uap yang keluar dari bibir autoklaf. Klep pengaman jangan dikencangkan terlebih dahulu. Kemudian autoklaf dinyalakan dan diatur *timer* dengan waktu minimal 15 menit pada suhu 121°C . Kemudian ditunggu sampai air mendidih sehingga uapnya memenuhi kompartemen autoklaf dan terdesak keluar dari klep pengaman. Kemudian klep pengaman ditutup (dikencangkan). Penghitungan waktu 15' dimulai sejak tekanan mencapai 2 atm. Jika alarm tanda selesai berbunyi, maka ditunggu sampai tekanan dalam kompartemen turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (nol). Kemudian klep-klep pengaman dibuka dan isi autoklaf dikeluarkan secara hati-hati. (Universitas Jendral Soedirman, 2008)

Penelitian pendahuluan dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi minimal dari bakteri *Lactobacillus plantarum* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri

Aeromonas salmonicida dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml. Penelitian pendahuluan ini dilakukan dengan metode kertas cakram. Konsentrasi bakteri *L. plantarum* yang digunakan adalah 10^1 CFU/ml, 10^2 CFU/ml, 10^3 CFU/ml, 10^4 CFU/ml, 10^5 CFU/ml, 10^6 CFU/ml, 10^7 CFU/ml, 10^8 CFU/ml yang dikultur pada media *de Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB). Kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3.500 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C . Dipisahkan antara supernatan dan pelet. (Joly *et al.*, 1990).

Bakteri *Aeromonas salmonicida* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml disebar pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) secara merata. Kemudian *paperdisc* atau kertas cakram dimasukkan ke dalam pelet dari bakateri *Lactobacillus plantarum* dan diamkan selama 5 menit agar dapat meresap sempurna. *Paperdisc* selanjutnya diletakkan di atas sebaran bakteri patogen *A. salmonicida* pada media TSA dengan kepadatan 10^6 sel/ml merujuk kepada prosedur Buntin *et al.*, (2008).

Penelitian utama ini dilakukan dengan metode kertas cakram. Konsentrasi bakteri *L. plantarum* yang digunakan adalah 10^5 CFU/ml, 10^6 CFU/ml, 10^7 CFU/ml, 10^8 CFU/ml yang dikultur pada media *de Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB). Kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3.500 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C . Dipisahkan antara supernatan dan pelet. (Joly *et al.*, 1990).

Bakteri *A. salmonicida* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml disebar pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) secara merata. Kemudian *paperdisc* atau kertas cakram dimasukkan ke dalam pelet dari bakateri *L. plantarum* dan didiamkan selama 5 menit agar dapat meresap sempurna. *Paperdisc* selanjutnya diletakkan di atas sebaran bakteri patogen *A. salmonicida* pada media TSA dengan kepadatan 10^6 CFU/ml merujuk kepada prosedur Buntin *et al.*, (2008). Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan 4 kali. Kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam untuk melihat hasil daya hambat dari *L. plantarum* tersebut.

Parameter uji utama pada penelitian ini adalah daerah hambatan bakteri *Lactobacillus plantarum* terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas salmonicida*. Pengukuran zona hambat dilakukan dengan mengukur diameter daerah yang jernih atau tidak ada pertumbuhan (Pradhika, 2008).

Analisis data hambatan yang dihasilkan *L. plantarum* terhadap pertumbuhan *A. salmonicida* menggunakan Analisis Varian (Anava) dan dilanjutkan dengan Uji Jarak

Berganda Duncan dengan tingkat kesalahan (error rate) $\alpha = 0,01$ dan akan diketahui perlakuan yang menghasilkan hambatan terbaik.

Hasil dan Pembahasan

Hasil pengamatan penelitian berupa hambatan yang dihasilkan oleh bakteri *L. plantarum* pada sebaran bakteri *A. salmonicida* dalam media TSA. Hambatan tersebut ditandai dengan adanya zona bening disekitar kertas cakram yang sebelumnya diberi suspensi *L. plantarum*. Hasil analisis varian (ANOVA) yang dilakukan menunjukkan bahwa perlakuan bakteri *Lactobacillus plantarum* memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Aeromonas salmonicida* ($P < 0,01$). Rata – rata diameter zona hambat yang dihasilkan *L. plantarum* pada sebaran *A. salmonicida* dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Rata – rata diameter zona hambat yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* pada sebaran *Aeromonas salmonicida* dalam milimeter (mm).

Perlakuan (CFU/ml)	Rata – rata diameter zona hambat \pm SD (mm)
E (10^9)	12,375 ^a \pm 1,567
D (10^8)	8,95 ^b \pm 0,443
C (10^7)	6,8 ^c \pm 0,938
B (10^6)	6 ^c \pm 0
A (Kontrol)	6 ^c \pm 0

Keterangan : Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Hasil uji jarak berganda Duncan $\alpha = 0,01$ yang dilakukan menunjukkan bahwa setiap perlakuan memiliki hasil yang berbeda. Dimana semakin tinggi konsentrasi *L. plantarum* yang diberikan maka semakin besar diameter hambatan yang dihasilkan. Urutan perlakuan terbaik adalah perlakuan *L. plantarum* dengan konsentrasi 10^9 (E), kemudian *L. plantarum* dengan konsentrasi 10^8 (D), sedangkan perlakuan *L. plantarum* dengan konsentrasi 10^7 (C) dan 10^6 (B) tidak berbeda nyata dengan kontrol atau tanpa *L. plantarum* (A).

Berdasarkan hasil uji jarak berganda Duncan $\alpha = 0,01$ dapat diketahui bahwa setiap perlakuan memiliki hasil yang berbeda. Dimana semakin tinggi konsentrasi *L. plantarum* yang diberikan maka diameter hambatan yang dihasilkan pada sebaran bakteri patogen *A. salmonicida* juga akan semakin besar. Pelczar dan Chan (1988) menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi suatu antibakteri maka aktivitas antibakterinya semakin kuat pula. Hal

ini dikarenakan bahwa dengan konsentrasi bakteri antagonis yang semakin tinggi maka kandungan zat antibakteri yang dihasilkan juga akan semakin banyak sehingga daya hambatnya terhadap bakteri uji akan semakin besar.

Hasil dari penelitian yang telah dilaksanakan menunjukkan bahwa bakteri *L. plantarum* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. salmonicida*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa bakteri *L. plantarum* memiliki potensi antagonistik terhadap bakteri patogen *A. salmonicida*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Gildberg *et al.* (1995), bahwa bakteri *L. plantarum* dapat menghambat atau menekan pertumbuhan dari bakteri patogen *A. salmonicida*.

Adanya daya hambat pada *Lactobacillus plantarum* terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Aeromonas salmonicida* dikarenakan *L. plantarum* tersebut memproduksi asam laktat. Rahayu dkk. (1992) menyatakan bahwa asam – asam organik misalnya asam laktat dan asam asetat menyebabkan penurunan pH sehingga suasana menjadi asam yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Menurut Isoken *et al.* (2012) bakteri patogen *A. salmonicida* dapat tumbuh pada kisaran pH 5 hingga 9. Sedangkan Fardiaz (1992) mengemukakan bahwa bakteri asam laktat (BAL) misalnya *L. plantarum* akan menghasilkan asam laktat yang dapat menurunkan nilai pH hingga 3 sampai 4,5. Hal ini diperkuat dengan pernyataan dari Weinberg dan Muck (1996) serta Merry *et al.* (1997) bahwa BAL dapat menurunkan Ph hingga 3,8 yang dikarenakan adanya produksi asam laktat dan asam - asam lainnya. Dengan keadaan pH yang demikian rendah, maka pertumbuhan bakteri patogen *A. salmonicida* akan terhambat.

Di samping itu, bakteriosin juga berperan dalam menghambat bakteri uji. Kusmiati dan Malik (2002) menyatakan bahwa, bakteriosin merupakan senyawa protein yang diekskresikan oleh bakteri yang memiliki sifat menghambat pertumbuhan bakteri lain terutama yang memiliki kekerabatan erat secara filogenik. Menurut Eckner (1992) mekanisme kerja bakteriosin dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji diawali dengan menempelnya molekul protein pada reseptor yang terdapat pada permukaan sel bakteri kemudian masuk melalui dinding sel dan kontak dengan membran. Hal ini akan menyebabkan membran sitoplasma menjadi tidak stabil, akibatnya viabilitas sel rendah dan menyebabkan keluarnya material dalam inti sel bakteri sehingga sel menjadi mati.

Selain itu, hidrogen peroksida juga memiliki peran dalam menghambat bakteri patogen. Jenie dan Rini (1995) melaporkan *L. plantarum* mampu memproduksi H₂O₂ dalam jumlah yang tinggi sehingga cukup potensial dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Lindgren dan Dobrogosz (1990) menyatakan hidrogen peroksida juga mempunyai efek bakterisidal yang menyebabkan oksidasi yang kuat pada sel bakteri dan merusak struktur molekul dasar dari protein sel. Hal ini diperkuat oleh Zalan *et al.*, (2005) yang menyatakan bahwa Hidrogen peroksida memiliki efek bakterisidal karena produksi superoksida oksigen dan radikal hidroksil yang menyebabkan oksidasi sel bakteri dan merusak struktur dasar molekul dari protein sel.

Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilaksanakan dapat diambil kesimpulan bahwa bakteri *Lactobacillus plantarum* memiliki potensi antagonistik terhadap bakteri patogen *Aeromonas salmonicida* yang ditandai dengan adanya hambatan yang dihasilkan bakteri *L. plantarum* pada pertumbuhan bakteri patogen *A. salmonicida*.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, penulis menyarankan adanya penelitian lanjutan menggunakan bakteri *L. plantarum* dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Hal ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi maksimal bakteri *L. plantarum* yang dapat menghasilkan hambatan terbesar pada pertumbuhan bakteri patogen *A. salmonicida*.

Daftar Pustaka

- Buntin, N., S. Chanthachum, and T. Hongpattarakere. 2008. Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 30 (Suppl.1): 141-148.
- Eckner KF, 1992. *Bacteriocins and food applications. Dairy Food and Env Sanitation.* 12: 204–9.
- Fardiaz, S., 1992. Mikrobiologi Pangan I. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Gildberg, A., A. Johansen and J. Bogwald. 1995. Growth and survival of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture.*138: 23-24.

- Isoken H. I., U. I. Ehimario, A. Farhad, T. Mvuyo, and I. O. Anthony. 2012. Emerging *Aeromonas* Species Infections and Their Significance in Public Health. The Scientific World Journal. Volume 2012 (2012), Article ID 625023, 13 pages.
- Jenie B.S.L. dan S.E. Rini, 1995. Aktivitas Antimikroba dari Beberapa Spesies *Lactobacillus* terhadap Mikroba Patogen dan Perusak Makanan. Buletin Teknologi dan Industri Makanan.
- Joly, P., R. Cailleux, and M.T. Cerceau. (1990). La stérilité male pathologique, élément de la co-adaptation entre populations de champignons et de plantes-hotes: modèle des Pleurotes des Ombellifères. Bulletin de la Societe Botanique de France 137, 71-85.
- Kusmiati, & A. Malik. 2002. Aktivitas bakteriosin dari bakteri *Leuconostoc mesenteroides* Pbac1 pada berbagai media Jurnal Makara Seri Kesehatan. Sistem Informasi Jurnal Ilmiah UI (Sijuri).
- Kusriningrum, R. S. 2008. Perancangan Percobaan. Universitas Airlangga. Surabaya. hal. 43-63.
- Lindgren S.E. dan W. J. Dobrogosz, 1990. Antagonistic activity of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microb. Rev.* 87: 149-64.
- McNaught, C.E., and J. Macfie. 2000. Probiotics in Clinical Practice: a critical review of the evidence. *Nutrition Research* 21 (2001) 343-353.
- Pelczar, M.J and E.C.S. Chan. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi 1. Penerjemah: R.S.Hadioetomo, T. Imas, S.S. Tjitrosomo dan S.L. Angka. UI-Press, Jakarta.
- Pradhika, E.I. 2008. Mikrobiologi Dasar : Kunci Awal Identifikasi Bakteri. Jakarta.
- Rahayu W. P., S. Ma'oen, S. Fardiaz dan Suliantari, 1992. *Teknologi Fermentasi Produk Perikanan*. PAU. IPB. Bogor. Shickney, R.R. 2000. *Encyclopedia of Aquaculture*. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Suriawiria, U. 1983. Mikrobiologi Masa Depan Penuh Kecerahan di Dalam Pembangunan. Biologi. ITB. Bandung. Universitas Jendral Sudirman. 2008. Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Dasar. Universitas Jendral Sudirman. Purokerto. hal. 9.
- Weinberg, Z.G., and R.E. Muck. 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.* 19, 53-68.
- Zalan, Z., E. Nemeth, A. Barath and A. Halasz, 2005. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technol. Biotechnol.*, 43: 219-225.
- Merry, R.J., K.F. Lowes, and A. Winters. 1997. Current and future approaches to biocontrol in silage. 17-27.