

Efektivitas Penghambatan Filtrat Asam Laktat *Lactobacillus Sp.* Hasil Isolasi Dari Usus Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) Terhadap Bakteri Patogen

Rieny Sulistijowati dan Lukman Mile

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Negeri Gorontalo
Gorontalo, 9612, Indonesia
Email:rinyulistijowati@gmail.com

Abstract

Lactic acid have potensial as bacterisidal or bacteriostatic. This research was conducted to know the effectiveness of filtrate lactic acid Lactobacillus Sp. from milkfish intestine according to concentrations toward zone of growth inhibition pathogen bacteria. This research was an experimentally research conducted in laboratory of BPPMHP Gorontalo used completely randomized design with two replications. Species of pathogen bacteria used were Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Salmonella paratyphi and E.coli.. The concentration filtrate lactic acid culture Lactobacillus sp used 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% and NaCl fisiologis 0,9% as control. The parameters were diameter (mm) of the zones of bacterial growth inhibition. The Results showed that treatment with filtrate of lactic acid concentration 50 to 100% effective can inhibition the growth of bacterial pathogen. This treatment provide that the filtrate lactic acid of culture Lactobacillus sp can be used as bio-preservative.

Keywords: Milkfish, Lactic Acid, Bio-preservative

I. PENDAHULUAN

Beberapa tahun terakhir sering timbul adanya bakteri yang resisten terhadap antibiotik yang disebabkan pemakaian antibiotik yang tidak mengikuti aturan yang benar, sehingga terjadi peningkatan secara ekstrim jumlah bakteri patogen dan non patogen yang resisten terhadap antibiotik termasuk bakteri patogen pada makanan. Akibatnya penggunaan pengawet kimia untuk makanan semakin tinggi.

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi keberadaan bakteri patogen dan bakteri pembusuk adalah menggunakan bakteri antagonis. Bakteri antagonis adalah bakteri yang memiliki sifat berlawanan dengan bakteri pembusuk, patogen atau yang tidak diharapkan. Bakteri antagonis sering disebut bakteri menguntungkan, karena dapat digunakan untuk menghambat atau menghentikan aktivitas bakteri yang merugikan dan tidak menimbulkan bahaya apabila dikonsumsi.

Sumberdaya perikanan bandeng khususnya bakteri yang berasosiasi dengan bandeng dapat menghasilkan metabolit sebagai biomedikal yang penting. Di dalam usus yang panjang tersebut terdapat berbagai jenis bakteri antara lain bakteri asam laktat (BAL) yang membantu proses pencernaan makanan. Selain fungsi tersebut BAL bersifat antagonis terhadap bakteri patogen. Bakteri asam laktat dapat diisolasi dan dikultur menghasilkan metabolit primer selanjutnya diuji aktivitas daya hambat terhadap bakteri patogen dan dikembangkan sebagai antibiotik baru.

Daya hambat suatu zat antimikrobia dapat diuji aktivitasnya. Uji aktivitas antimikroba dari suatu senyawa atau suatu zat, dimaksudkan untuk mengetahui kemampuan zat tersebut untuk menghambat pertumbuhan atau bahkan dapat membunuh suatu mikroba tertentu. Uji aktivitas antimikroba tersebut dapat dilakukan melalui metode pengenceran dan metode difusi agar [1].

Tujuan penelitian adalah diperoleh informasi aktivitas penghambatan bakteri asam laktat hasil isolasi dari ikan bandeng terhadap pertumbuhan bakteri patogen. Hasil tersebut diharapkan pada masa yang akan datang dapat digunakan sebagai pengembangan bioteknologi antibiotik baru untuk biopreservatif pada pengolahan hasil perikanan.

Urgensi penelitian adalah tingginya kebutuhan antibiotik mendorong perlu dilakukan temuan antibiotik baru yang resisten terhadap bakteri patogen. Sumber antibiotik secara alami banyak bersumber dari alam antara lain mikroorganisme yang memiliki kemampuan antagonis terhadap bakteri patogen. Bakteri asam laktat yang berasosiasi dengan ikan bandeng (*Chanos chanos*) dapat berpotensi sebagai antibiotik baru. Berdasarkan urgensi di atas maka dilakukan penelitian tentang Efektivitas Penghambatan Filtrat Asam Laktat *Lactobacillus Sp.* Hasil Isolasi Dari Usus Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) Terhadap Bakteri Patogen.

II. KAJIAN LITERATUR DAN HIPOTESIS

Ikan bandeng yang berkembang biak di perairan air payau memiliki karakteristik berbadan langsing, sirip bercabang, sisik seperti kaca dan berdaging putih. Di samping itu memiliki keunikan, yakni mulutnya tidak bergigi dan makanannya adalah tumbuh-tumbuhan dasar laut. Selain itu panjang usus bandeng 9 kali panjang badannya [2]. Di dalam usus yang panjang tersebut terdapat berbagai jenis bakteri antara lain bakteri asam laktat (BAL) yang membantu proses pencernaan makanan. Selain fungsi tersebut BAL bersifat antagonis terhadap bakteri patogen. Bakteri asam laktat dapat diisolasi dan diuji aktivitas antagonis terhadap bakteri patogen dan dikembangkan sebagai antibiotik baru. Berdasarkan hasil penelitian [3], berhasil mengisolasi bakteri asam laktat dari usus ikan bandeng. Berdasarkan identifikasi menggunakan panduan Bergey, isolat RS6, RS7 dan RS9 adalah genus *Lactobacillus* sedangkan isolat lainnya adalah genus *Leuconostoc*.

Kelompok bakteri asam laktat mampu sebagai bakteri antagonis, kelompok BAL antara lain *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus faecalis* dan *S. lactis*. Kemampuan tersebut disebabkan BAL menghasilkan metabolit selama pertumbuhannya antara lain asam laktat dan bakteriosin [4].

Beberapa hasil penelitian lain yang menunjang antara lain; [5] melakukan penelitian potensi filtrat *L. acidophilus* sebagai biopreservatif rebusan daging ikan tongkol pada pengolahan *arabushi*. [6] telah meneliti aktivitas antagonis bakteri yang berasosiasi dengan *Balanus Amphitrite* terhadap bakteri patogen manusia.

Hipotesis : Filtrat asam laktat *Lactobacillus sp.* efektif menghambat bakteri patogen.

III. METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Pelaksanaan penelitian dilakukan di BPPMPH Propinsi Gorontalo pada bulan Januari s/d Maret 2015.

2.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan antara lain: isolat *Lactobacillus sp.* hasil isolasi dari usus ikan bandeng, isolat bakteri patogen (*B.cereus*, *S.aureus*, *Salmonella*, dan *E.coli*), BHI, muller hinton agar, BSA, Hi crome coliform, aguades, kertas saring, kertas antibiotik, bulyon gula tebu, BaCl₂, H₂SO₄, alkohol, spiritus kapas, dll.

Peralatan yang dipakai yaitu: autoklaf, oven, hot plate, inkubator, laminary air flow, sentrifus, cawan petri, tabung reaksi, erlemeyer, gelas ukur, pipet drop, ose, bunsen, jangka sorong, masker, kamera dll.

2.3 Metode Penelitian

Sebelum dilakukan pengujian pengaruh jenis bakteri dan konsentrasi filtrat (asam laktat) *Lactobacillus sp* terhadap diameter daerah hambat bakteri patogen, dilakukan uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) filtrat asam laktat *Lactobacillus sp.* terhadap bakteri patogen. Penelitian ini menggunakan metode observasi dengan 4 strain bakteri patogen yaitu *B.cereus p₁*, *Salmonella p₂*, *Vibrio cholera p₃* dan *S.aureus p₄* serta berbagai konsentrasi filtrat (asam laktat) *Lactobacillus* yaitu, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% . Pengamatan dilakukan secara deskriptif dengan melihat pertumbuhan bakteri patogen medium spesifik di dalam cawan petri.

Untuk uji efektivitas terhadap bakteri patogen, metode penelitian yang digunakan adalah secara eksperimental di laboratorium dengan metode difusi menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola faktorial 4 x 9. Filtrat yang digunakan dari

kultur *Lactobacillus* berumur 18 jam. Faktor I adalah jenis bakteri patogen dengan 2 taraf perlakuan yang mewakili bakteri Gram positif yaitu *Bacillus cereus* dan *Staphylococcus aureus*, serta Gram negatif yaitu *Salmonella paratyphi* dan *Escherichia coli*. Faktor II adalah konsentrasi filtrat yang digunakan dengan 9 taraf konsentrasi, yaitu kontrol, 30,40,50, 60, 70,80,90 dan 100%.

Parameter yang diamati adalah besarnya daerah hambat yang dibentuk filtrat yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen. Penelitian diulang 2 kali sehingga diperoleh 72 unit percobaan. Data kemudian dianalisis dengan menggunakan ANAVA (Analisis Varians) dan dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan jika berbeda nyata. Efektifitas filtrat asam laktat diperoleh dari konsentrasi minimum yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri kontaminan.

2.4 Prosedur Penelitian KHM

- Sterilisasi Alat dan Bahan [7]

Temperatur sterilisasi autoklaf 121°C dan tekanan 1 atm (15 lbs), selama 15 menit.

- Peremajaan *Lactobacillu sp* (Bundesgesundhetsrat, 1976 dalam [8])

Kultur murni *Lactobacillus sp* diaktivasi sebanyak 2 kali. kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

-Pembuatan Filtrat (Asam Laktat) *Lactobacillus* [9] dan [10]

Sebanyak 1 mL suspensi bakteri *Lactobacillus* aktif dikultur dalam 9 mL MRS Broth dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam. Kemudian disentrifus pada 6000 rpm suhu 4°C selama 15 menit untuk memisahkan sel dengan filtratnya. Kemudian disaring dengan membran *millipore* ukuran 0,45 mikrometer. Kemudian filtrat (asam laktat) dipapar di bawah sinar UV selama 40 menit, selanjutnya dilakukan pembuatan konsentrasi filtrat asam laktat *Lactobacillus sp.* 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%.

- Peremajaan Isolat Bakteri Patogen (Bundesgesundhetsrat, 1976 dalam [8]).

Sebelum pengujian daya antibakteri, bakteri uji terlebih dahulu diremajakan sehingga diperoleh dalam keadaan aktif. Peremajaan tersebut dilakukan dengan tahapan sebagai berikut, yaitu masing-masing biakan murni ditanam ke dalam media spesifik BHI Broth kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri yang telah tumbuh kemudian ditumbuhkan ke dalam BHI agar kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh kemudian ditanam ke dalam 10 mL media bulyon gula tebu.

-Penentuan Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) (Bundesgesundhetsrat, 1976 dalam [8]).

KHM dilakukan untuk mengetahui konsentrasi minimal Untuk menentukan KHM dilakukan beberapa prosedur yaitu, bakteri patogen yang telah aktif diambil 1 ose dan distreak

pada BHI *agar* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi dikerok dan dimasukkan ke dalam NaCl Fisiologis 0,9 persen steril dan disentrifugasi. Hasil sentrifugasi dicuci dengan NaCl Fisiologis 0,9 persen steril sebanyak 2 kali dan disentrifugasi, setelah itu hasilnya disetarakan dengan kekeruhan *Mc Farland 1* yaitu 3×10^8 CFU/mL. Selanjutnya 1 mL suspensi bakteri patogen ditambahkan ke dalam filtrat asam laktat pada masing-masing konsentrasi kemudian diambil satu ose dan distreak pada medium spesifik bakteri patogen yang telah beku dalam cawan petri steril. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat pertumbuhan bakteri patogen pada medium spesifik di dalam cawan petri.

2.5 Prosedur Penelitian Efektivitas filtrat asam laktat terhadap bakteri patogen [9] dan [10]

Uji efektivitas Filtrat Asam Laktat dilakukan dengan metode difusi agar (kertas cakram). Koloni bakteri uji (bakteri patogen) yang telah diaktifkan diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam 9 mL bulyon gula tebu, inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya 0,1 mL suspensi bakteri dituangkan pada cawan petri steril kemudian 20 mL medium Muller Hinton agar steril dituangkan ke dalam petri yang telah berisi suspensi kemudian dihomogenkan dengan cara diputar hingga homogen. Medium dan suspensi bakteri dibiarkan membeku. Setelah medium membeku, kertas cakram yang telah direndam dengan 0,5 mL filtrat asam laktat dengan masing-masing konsentrasi perlakuan diletakkan secara steril di atas medium. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pengamatan dilakukan dengan mengukur zona penghambatan berdasarkan diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram setelah masa inkubasi. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan sesuai dengan standar pengukuran daerah hambat yang ditetapkan NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), yang kemudian dikelompokkan kedalam kelompok sensitif, sensitif sedang, dan resisten. Efektifitas filtrat (asam laktat dan bakteriosin) terhadap bakteri patogen adalah konsentrasi minimum yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri kontaminan dan bakteri patogen.

2.6 Rancangan Analisis [11]

Model matematis ANAVA yang digunakan sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \sum_{ij}$$

Keterangan :

- Y_{ij} = Nilai pengamatan pada satuan percobaan yang memperoleh kombinasi perlakuan pada taraf ij (taraf ke-i dari jenis patogen dan taraf ke-j dari konsentrasi filtrat)
- μ = Nilai tengah populasi (rata-rata yang sesungguhnya)
- α_i = Pengaruh perlakuan α (jenis bakteri patogen) pada taraf ke-i
- β_j = Pengaruh perlakuan β (konsentrasi filtrat) pada taraf ke-j

- $(\alpha\beta)_{ij}$ = Interaksi antara perlakuan α taraf ke-i dan perlakuan β taraf ke-j
- \sum_{ij} = Pengaruh galat dari satuan percobaan yang memperoleh kombinasi perlakuan pada taraf ij

Model Matematis Uji Jarak Ganda Duncan's sebagai berikut :

$$s\hat{Y} = (S^2/r)^{1/2}$$

Keterangan:

- $s\hat{Y}$ = Galat baku dari nilai tengah perlakuan
- S^2 = Kuadrat tengah galat
- r = Replikasi

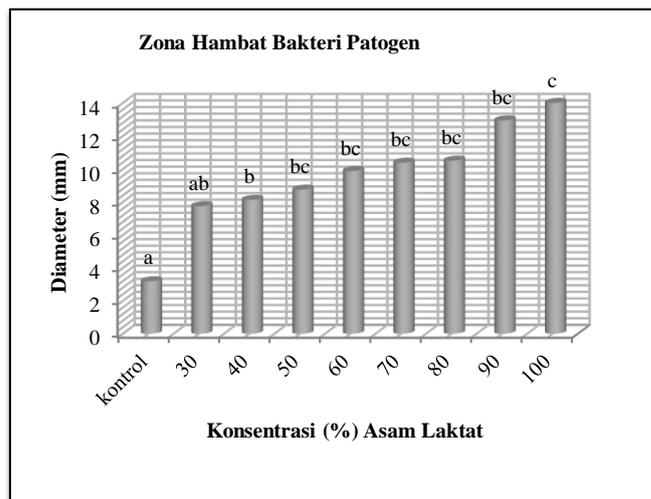
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Uji KHM

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) filtrat asam laktat *Lactobacillus sp.* terhadap bakteri patogen diperoleh *B.cereus* 70%, *S. aureus* 60%, *Salmonella* 40% dan *E.coli* 30%.

4.1 Hasil Uji Efektivitas Filtrat Asam Laktat *Lactobacillus sp.* terhadap Bakteri Patogen

Efektivitas filtrat asam laktat kultur *Lactobacillus sp* terhadap bakteri patogen dapat dilihat pada Gambar 1. Pada Gambar tersebut terlihat bahwa konsentrasi filtrat asam laktat 30 sampai 100 persen menghasilkan zona hambat pada setiap bakteri patogen.



Gambar 1. Grafik Pengaruh Konsentrasi Filtrat Asam terhadap Rata-Rata Diameter Zona Hambat Bakteri Patogen.

Untuk menguji pengaruh konsentrasi filtrat asam laktat kultur *Lactobacillus sp.* terhadap bakteri patogen maka dilakukan analisis variansi. Berdasarkan hasil uji ANAVA menunjukkan bahwa konsentrasi filtrat asam laktat memberikan pengaruh sangat nyata terhadap diameter zona

hambat bakteri patogen *B. cereus*, *S. aureus*, *E.coli* dan *Salmonella paratyphi*. Hal ini berarti bahwa peningkatan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dengan pemberian berbagai konsentrasi filtrat asam laktat berbeda untuk setiap perlakuan. Untuk mengetahui kelompok perlakuan sama atau berbeda dilakukan uji jarak berganda Duncan. Hasil uji jarak berganda Duncan tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Konsentrasi Filtrat Asam Laktat terhadap Rata-Rata Diameter Zona Hambat Bakteri Patogen

Konsentrasi (%)	Diameter(mm)
Kontrol	3.19 a
30	7.75 ab
40	8.13 b
50	8.75 bc
60	9.88 bc
70	10.38 bc
80	10.5 bc
90	12.94 bc
100	14 c

Keterangan: Huruf yang sama secara vertikal menunjukkan tidak ada perbedaan pada derajat kepercayaan 99 %

 Perlakuan yang memberikan pengaruh yang sama pada derajat kepercayaan 99 %

Berdasarkan hasil uji jarak berganda Duncan pada Tabel 1 menunjukkan bahwa filtrat asam laktat konsentrasi 50 persen (diameter 8.75 mm) sampai 100 persen (diameter 14 mm) mampu memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri patogen *B.cereus*, *S.aureus*, *S.paratyphi* dan *E.coli*. Filtrat *Lactobacillus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli*, bahkan filtrat yang sudah disimpan selama 6 bulan memiliki kemampuan yang sama. *Lactobacillus* juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri lain yang merugikan atau patogen (Tagg *et al*, 1976; Chassy, 1987 dalam [12]). Beberapa substansi antimikrobal yang dihasilkan bakteri probiotik, diantaranya adalah *L. acidophilus* menghasilkan acidotin, acidophilin, bacteriocin, lactocidin; *L.bulgaricus* (bulgarican), *L. plantarum* (lactolin), *L. brevis* (lactobullin, lactobrevin), dan *L. reuteri* (rauterin).

Hasil penelitian [13], penggunaan asam laktat *Lactobacillus plantarum* konsentrasi 96% pada makanan fermentasi berbasis beras dapat menghambat pertumbuhan *E.coli*. Beberapa faktor yang memengaruhi kemampuan daya hambat yaitu, konsentrasi atau intensitas zat antimikrobal,

jumlah mikroorganisme, suhu, spesies mikroorganisme, adanya bahan organik dan derajat keasaman (pH) [14].

Filtrat *Lactobacillus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli*, bahkan filtrat yang sudah disimpan selama 6 bulan memiliki kemampuan yang sama. *Lactobacillus* juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri lain yang merugikan atau patogen (Tagg *et al*, 1976; Chassy, 1987 dalam [12]).

Mekanisme penghambatan terjadi karena asam laktat dalam bentuk tidak terdisosiasi dapat menembus membran sel. Selain itu, asam laktat yang dihasilkan dalam fermentasi juga mampu menurunkan pH dan keadaan ini akan mengganggu aktivitas enzim sehingga sel tidak dapat melakukan aktivitas metabolisme [4].

V. SIMPULAN DAN SARAN

Pada hasil uji efektivitas dengan menggunakan asam laktat yang dihasilkan oleh *Lactobacillus sp.* terhadap bakteri patogen, berbagai konsentrasi filtrat asam laktat yaitu konsentrasi 50 sampai 100 persen mampu membentuk diameter zona hambat pertumbuhan bakteri patogen. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut efektif menghambat bakteri patogen (*Bacillus cereus*, *Staphilococcus aureus*, *Salmonella paratiphy* dan *E.coli*).

DAFTAR PUSTAKA

- [1] G.J.F.Tortora, B.R. Case dan C.L. Case. *Microbiology an Introduction*. California: Addison Wesley Longman, Inc. 532. 1998.
- [2] B.A. Murtidjo, .*Bandeng*. Karnisius. Yogyakarta. 2002.
- [3] R. Sulistijowati, "Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Milkfish Intestine (Chanos chanos)", *Proceeding Intenational Seminar Innovation on Marine and Fisheries Product Processing and Biotechnology Towards the Asean Economic Community in 2015*. Jakarta. 2014.
- [4] B. Ray, *Fundamental Food Microbiology*. 3rd Edition CRC Press, Boca Raton. New York. 225 – 238. 2004.
- [5] R.Sulistijowati, "The Influence Culture Age and Soaking Time Range with Filtrate *L.acidophilus* toward The Number of Coliform bacteria in Swordfish stew", *Journal Agriculture. Journal Biology Agryculture and Healthcare* Vol 3 No.4. 2013.
- [6] S.E.J, Jebasingh, dan A.Marugan A. " Antagonis Activity of the Barnacle (Balanus Amphitrite) Associated Bacteria Against Human Bacterial Pathogen". *Journal of Medical Sciences* 6 (1):36-41.2011.
- [7] J.G. Cappucino dan N.Sherman, *Microbiology A Laboratory Manual*. New York. 2005.
- [8] J.Nurhajati, "Identifikasi Isolat Salmonella Dari Itik dan Lingkungan Sekitar Serta Pengujian Sifat-sifat Biologi," Disertasi, Universitas Padjadjaran, Bandung. 1991.

- [9] L.H Deegan, D.C. Paul., H. Colin and R. Paul. "Bacteriocins : Biological Tools for Biopreservatio and Shelf-life extension", *International dairy Journal*.2005
- [10] S.T, Ogunbanwo, A. I. Sanni dan A. A. Onilude. "Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OGI", *African Journal of Biotechnology*. 2(8):pp.219-227. 2003.
- [11] R.G.D, Steel dan J.H Torrie, J.H. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Suatu Pendekatan Biometrik. PT Gramedia Pustaka, Jakarta, 1991.
- [12] R. Hardiningsih, R.N.N. Rostiati, dan Y. Titin, "Isolasi dan Uji Resistensi Beberapa Isolat *Lactobacillus* pada pH Rendah" Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Bogor. *Jurnal Biodiversitas* 7(1): 15- 17. 2005.
- [13] R.M Yusof, J.B. Morgan dan M.R Adam, "Bacteriological safety of a fermented weaning food containing L- lactate and nicin", *Jornal Food Protection* 56. 414-417. 1993.
- [14] M.J Pelczar dan E.C.S Chan. *Dasar-dasar Mikrobiologi* Jilid 1 . Penerjemah: Ratna Siri Hadioetomo : Penerbit UI Press, Jakarta, 2006.