

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 1. Isolasi dan Karakterisasi bakteri asam laktat

Hasil inokulasi pada media agar MRS dan GYP+CaCO<sub>3</sub> ditemukan sebanyak 21 isolat bakteri asam laktat dengan ukuran koloni berbeda dan menunjukkan zona jernih disekitar koloninya (Gambar 1). Morfologi koloni dan morfologi sel semua isolat bakteri mempunyai karakter yang hampir sama (Tabel 1). Semua koloni isolat berbentuk bulat. Sebagian besar koloni berwarna putih susu dan putih krem. Ukuran koloni berkisar antara 0,25 mm sampai 2,0 mm. Bentuk sel bakteri adalah batang, Gram positif dan nonmotil.

Pada uji biokimia didapatkan hampir tidak ada perbedaan antara isolat-isolat yang diduga bakteri asam laktat. Semua isolat bersifat katalase negatif, tidak mempunyai sitokrom oksidase dan enzim gelatinase. Uji *methyl red* (MR) dan Voges-Proskauer (VP) negatif. Sebagian besar isolat menggunakan karbohidrat dengan metabolisme oksidatif dan fermentatif (fakultatif anaerob), dan memproduksi asam dari gula-gula yang diuji (glukosa, galaktosa, laktosa, maltosa, D-manitol, rafinosa, sorbitol. Namun pada uji hidrolisis arginin semua isolat menunjukkan hasil negatif.

Pertumbuhan isolat bakteri asam laktat pada kondisi pH dan suhu berbeda lebih bervariasi. Semua mampu tumbuh pada pH 3, 4, 5 dan 6. Sebanyak 7 isolat dapat tumbuh baik pada suhu 15°C dan 45°C, namun 11 isolat tidak tumbuh pada suhu 15°C, dan 3 isolat tidak tumbuh baik pada suhu 15°C maupun 45°C.

Berdasarkan pengamatan morfologi koloni, morfologi sel, uji biokimia, dan sifat fisiologi, sebagian besar isolat mempunyai karakteristik yang hampir sama. Dengan merujuk kepada buku identifikasi bakteri menurut Holt *et al.*, (2000), maka semua isolat bakteri yang

diuji dapat dikategorikan kedalam kelompok bakteri asam laktat, yaitu dari genus *Lactobacillus*. *Lactobacillus* sp. termasuk bakteri Gram positif, sel tidak menghasilkan spora, non-motil, fakultatif anaerob, kadang-kadang mikroaerofilik, tumbuh lebih baik dengan adanya oksigen tereduksi, sebagian anaerob, dan tumbuh optimum pada suhu 30-40°C. Koloni pada media agar biasanya 2-5 mm, konveks, penuh dan opak dan tidak berpigmen, sel berbentuk batang regular dengan ukuran 0,5-1,2 x 1,0-10,0 um; kemoorganotrofik, dan tumbuh hanya pada media kompleks; metabolisme fermentatif dan sakaroklastik, sebagian dari produk akhirnya adalah laktat; tidak mereduksi nitrit, gelatin tidak mencair, katalase dan sitokrom negatif. *Lactobacillus* sp. tersebar luas di lingkungan terutama pada hewan dan produk makanan sayur-sayuran, biasanya mendiami saluran usus burung dan mamalia, dan vagina mamalia, dan tidak bersifat patogen (Holt *et al.*, 2000).



Gambar 1. Hasil isolasi bakteri asam laktat pada medium GYP+CaCO<sub>3</sub> menunjukkan zona jernih disekitar koloni bakteri.

Karakteristik	K.SBU 5Aa	K.SBU 5Ab	K.SBU 5Ca	K.SBU 5Cb	K.SBU 5Db	K.SBU 9	K.SBU 13B	K.SBU 14B	K.SBU 5Ba	K.SBU 5Bb	K.SBU 5Da
Bentuk koloni	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat
Warna koloni	PS	PS	PS	PS	PS	PK	PS	PS	PS	PS	PS
Ukuran koloni (mm)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5	0,25
Morfologi sel	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang
Sifat Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilitas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSIA	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
Produksi H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	F	O/F	O/F	O/F	O/F
Spora	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Acid Fast	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pertumbuhan pada 15°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pertumbuhan pada 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrolisis gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sifat Aerobiosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas dari glucose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Produksi Asam dari:											
- Glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Galaktosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- D-mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Raffinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Hidrolisis Arginin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Karakteristik	4B	12A	12B	12C	13C	13D	14A	11A	11B	11C
Bentuk koloni	Bulat									
Warna koloni	PK	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PK	PS	PS
Ukuran koloni (mm)	2,0	0,5	0,5	1,0	1,0	1,5	1,0	1,0	1,0	1,5
Morfologi sel	Batang									
Sifat Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilitas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSIA	K/A	A/A	A/A	A/A	K/K	K/A	A/A	A/A	A/A	K/K
Produksi H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	F	O/F	O/F	O/F	O/F	F
Spora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid Fast	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pertumbuhan pada 15 °C	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Pertumbuhan pada 45 °C	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Hidrolisis gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sifat Aerobiosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas dari Glukose	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+
Produksi Asam dari:										
- Glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Galaktosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Laktosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- D-mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Raffinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Hidrolisis Arginin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: + : positif, - : negatif, PK: putih krem, PS: putih susu, K/A: alkali/asam, A/A: asam/asam, K/K: alkali/alkali, O/F: oksidatif/fermentatif.

## 2. Seleksi Bakteri Asam Laktat sebagai Probiotik

### Aktivitas antivibrio

Isolat-isolat bakteri asam laktat yang didapat mempunyai daya hambat dan aktivitas berbeda terhadap *V. alginolyticus* (Gambar 2). Diameter zona hambat berkisar antara 8 mm sampai 21,5 mm dengan aktivitas antivibrio antara 0 sampai 14 unit (Tabel 2). Aktivitas antivibrio 1 unit adalah diameter zona hambat dikurangi dengan diameter *paperdisc* (8 mm). Dari 21 isolat tersebut, hanya 20 isolat yang mampu menghambat *V. alginolyticus*. Sebanyak 2 isolat mempunyai zona hambat antara 10-15 mm, 17 isolat mempunyai zona hambat antara 15-20 mm, 1 isolat (KSBU 12C) menunjukkan aktivitas antivibrio tertinggi, yaitu di atas 20 mm, sedangkan 1 isolat (KSBU 5Bb) tidak menunjukkan aktivitas antivibrio (0,0 mm). Hasil penelitian ini lebih baik daripada hasil yang didapat oleh Balcazar *et al.* (2008), dimana dari 3 isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari *Rainbow trout*, hanya *Lactococcus lactis* yang mampu menghambat pertumbuhan *V. anguillarum* dan *Yersinia ruckeri* dengan zona hambat di atas 10 mm, dan terhadap *Aeromonas hydrophila* dan *A. salmonicida* dengan zona hambat di atas 15 mm.



Gambar 2. Zona jernih disekitar *paper disc* ditandai dengan garis hitam ditengah

abel 2. Diameter zona hambat dan aktivitas antivibrio dari isolat bakteri asam Laktat

No.	Isolat	Rata-rata Diameter zona hambat (mm)	Aktivitas antivibrio (unit)
1.	KSBU4B	16,0 ±0,283	8,0
2.	KSBU5Aa	18,0 ±0,141	10,0
3.	KSBU5Ab	16,0 ±0,283	8,0
4.	KSBU5Ba	17,5 ±0,000	9,5
5.	KSBU5Bb	8,0 ±0,000	0
6.	KSBU5Ca	18,0 ±0,141	10,0
7.	KSBU5Cb	16,5 ±0,000	8,5
8.	KSBU5Da	19,0 ±1,141	11,0
9.	KSBU5Db	17,0 ±0,707	9,0
10.	KSBU9	18,0 ±0,141	10,0
11.	KSBU11A	14,9 ±0,141	6,9
12.	KSBU11B	16,1 ±0,141	8,1
13.	KSBU11C	14,0 ±0,283	6,0
14.	KSBU12A	16,5 ±0,283	8,5
15.	KSBU12B	17,0 ±0,283	9,0
16.	KSBU12C	21,5 ±0,707	13,5
17.	KSBU13B	17,5 ±0,000	9,5
18.	KSBU13C	17,5 ±0,141	9,5
19.	KSBU13D	19,3 ±0,141	11,3
20.	KSBU14A	15,1 ±0,283	7,1
21.	KSBU14B	17,0 ±0,141	5,9
22.	Kontrol positif	19,0 ±0,000	11,0
23.	Kontrol negatif	0,0 ±0,000	0

Dibandingkan dengan *chloramphenicol* sebagai kontrol positif, kemampuan isolat KSBU12C dan KSBU13D sebagai antivibrio lebih tinggi, dan isolat KSBU5Da sama dengan antibiotik tersebut. Ini menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri tersebut dapat digunakan sebagai antivibrio menggantikan

*chloramphenicol* yang sering digunakan dalam penanggulangan penyakit bakterial pada budidaya perairan. *Chloramphenicol* bersifat bakteriosidal atau bakteriostatik dengan mekanisme kerja menghambat sintesis protein pada struktur sel yaitu ribosom, pada dosis tinggi dapat berdampak pada hewan dan manusia yang ribosomnya sama dengan ribosom pada bakteri. Antibiotik ini termasuk yang telah dilarang penggunaannya dalam produk makanan oleh FDA karena dapat menginduksi anemia aplastik pada manusia (Serrano, 2005).

Efek penghambatan yang ditunjukkan oleh isolat bakteri asam laktat dapat disebabkan oleh asam atau substansi seperti bakteriosin atau kombinasi keduanya (Aslim *et al.*, 2005). Selain produksi bakteriosin sebagai cara kerja antagonistik dari probiotik, produksi asam-asam organik seperti asam laktat dan asam asetat juga penting, seperti aktivitas bakteri asam laktat terhadap patogen pada ikan *Turbot* (Vazquez *et al.*, 2005) dan asam-asam organik pada salmon asap (Tome *et al.*, 2006).

#### **Toleransi isolat BAL terhadap pH dan bile salts**

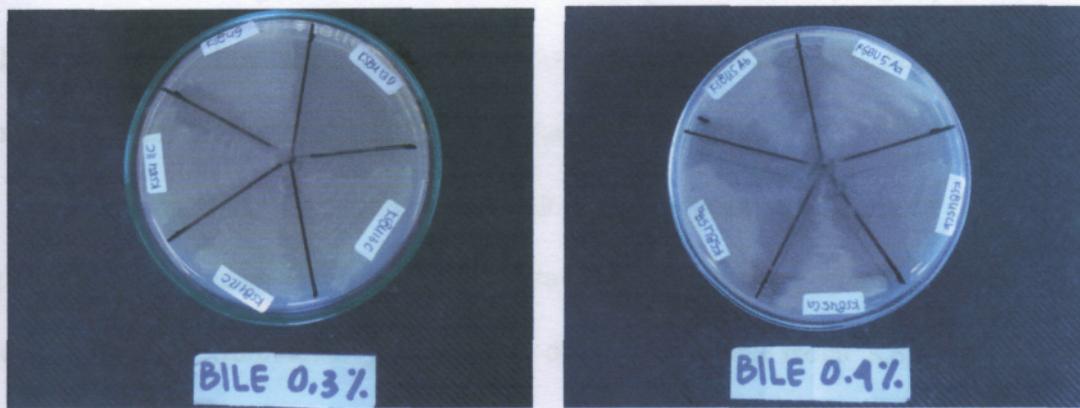
Bakteri asam laktat yang diisolasi dari ikan Kerapu Macan bersifat resisten dan dapat hidup pada kondisi pH rendah. Dari hasil pengukuran kerapatan optik (OD) dari kultur cair isolat BAL dengan pH 3, 4, 5 dan 6 (Tabel 2), nilai OD tertinggi berturut-turut didapatkan dari isolat KSBU 14B, KSBU 13C, KSBU 14B dan KSBU 12B. Hasil penelitian ini menunjukkan hasil yang sama dengan hasil yang didapatkan oleh Balcazar *et al.* (2008) dimana BAL strain *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* dan *L. fermentum* dapat hidup pada kisaran pH 2,5 sampai 6,5.

Tabel 3. Nilai OD ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) rata-rata dari kultur cair isolat BAL pada kisaran pH berbeda

No.	Isolat	pH			
		3	4	5	6
1.	KSBU4B	0.074±0.000	0.008±0.002	0.160±0.007	0.322±0.001
2.	KSBU5Aa	0.037±0.001	0.035±0.003	0.047±0.001	0.324±0.003
3.	KSBU5Ab	0.038±0.004	0.017±0.010	0.039±0.004	0.314±0.001
4.	KSBU5Ba	0.125±0.002	0.037±0.003	0.134±0.002	0.049±0.005
5.	KSBU5Ca	0.025±0.001	0.022±0.005	0.070±0.008	0.333±0.001
6.	KSBU5Cb	0.139±0.003	0.032±0.002	0.127±0.003	0.027±0.003
7.	KSBU5Da	0.127±0.001	0.042±0.001	0.106±0.003	0.015±0.001
8.	KSBU5Db	0.076±0.008	0.008±0.000	0.126±0.004	0.326±0.003
9.	KSBU 9	0.107±0.005	0.010±0.004	0.157±0.005	0.330±0.001
10.	KSBU11A	0.081±0.000	0.006±0.002	0.206±0.004	0.348±0.025
11.	KSBU11B	0.085±0.002	0.012±0.002	0.125±0.007	0.018±0.004
12.	KSBU11C	0.127±0.004	0.026±0.002	0.158±0.003	0.013±0.004
13.	KSBU12A	0.122±0.016	0.009±0.001	0.171±0.001	0.324±0.003
14.	KSBU12B	0.035±0.004	0.008±0.001	0.138±0.009	0.366±0.031
15.	KSBU12C	0.082±0.003	0.049±0.001	0.137±0.009	0.013±0.003
16.	KSBU13B	0.037±0.000	0.012±0.001	0.141±0.001	0.005±0.006
17.	KSBU13C	0.076±0.010	0.050±0.004	0.074±0.001	0.013±0.001
18.	KSBU13D	0.130±0.006	0.020±0.003	0.170±0.010	0.014±0.002
19.	KSBU14A	0.143±0.004	0.012±0.001	0.168±0.006	0.019±0.001
20.	KSBU14B	0.157±0.000	0.039±0.003	0.223±0.009	0.023±0.007
21.	Kontrol	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000

Toleransi terhadap empedu ikan (*fish bile*) adalah penting bagi strain probiotik untuk tumbuh dan hidup pada usus ikan. Dari hasil penelitian ini didapatkan 19 isolat BAL (95%) dapat tumbuh pada medium agar MRS dengan konsentrasi *bile salts* 0,2% sampai 0,5% (Gambar 3). Hasil ini lebih baik dari hasil yang didapat oleh Buntin *et al.* (2008) dari 160 isolat yang diuji, berturut-turut hanya 43,12%, 20,00% dan 11,85% isolat yang dapat tumbuh pada *bile salts* 2000, 3000 dan 4000 ppm. Sedangkan hasil penelitian Balcazar *et al.*, (2008) menunjukkan hasil tidak ada

perbedaan jumlah yang signifikan antara strain BAL yang diuji pada PBS yang mengandung konsentrasi *fish bile* 2,5 sampai 10%.



Gambar 3. Pertumbuhan isolat BAL pada konsentrasi *bile salts* berbeda. Isolat KSBU 13D tidak tumbuh pada semua konsentrasi *bile salts* yang diuji.

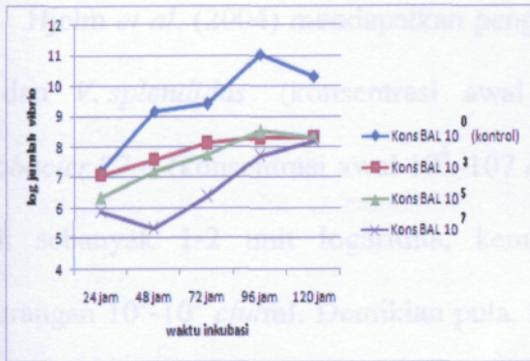
#### **Patogenitas isolat BAL terhadap ikan**

Salah satu kriteria penting untuk pemilihan calon probiotik adalah bahwa organisme tersebut harus bersifat nonpatogenik terhadap inang. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua isolat BAL dengan konsentrasi masing-masing  $10^7$  sel/ml yang diinfeksi tidak menimbulkan infeksi dan penyakit pada ikan Kerapu Macan dengan tingkat sintasan (*survival rate*) 100%. Selama tujuh hari pengamatan, ikan menunjukkan pergerakan aktif, nafsu makan tinggi dan cenderung bergerombol di dasar bak pemeliharaan. Hasil yang sama juga didapatkan dari hasil penelitian Aly *et al.* (2008b), yaitu *Bacillus subtilis* dan *Lactobacillus acidophilus* yang diinjeksi intraperitoneal (IP) tidak berbahaya dan tidak menimbulkan kematian pada ikan *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) selama 15 hari pengamatan. Sementara itu,

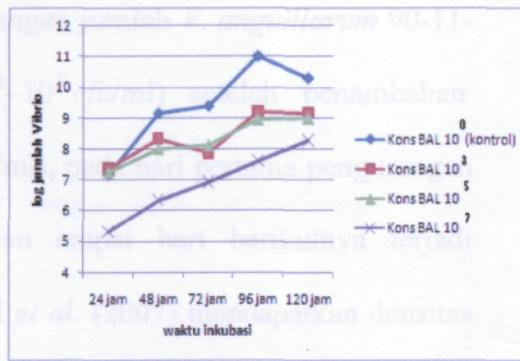
ieira *et al.* (2007) mendapatkan strain B6 dari 14 strain bakteri asam laktat yang diisolasi dari saluran pencernaan udang, dan ditambahkan ke dalam air media pemeliharaan larva udang *Litopenaeus vannamei*. Tingkat sintasan yang diperoleh adalah 79,8% setelah ditantang dengan *Vibrio harveyi* dan 73,3% tanpa *V. harveyi*.

#### **Kemampuan isolat BAL menghambat pertumbuhan *V. alginolyticus***

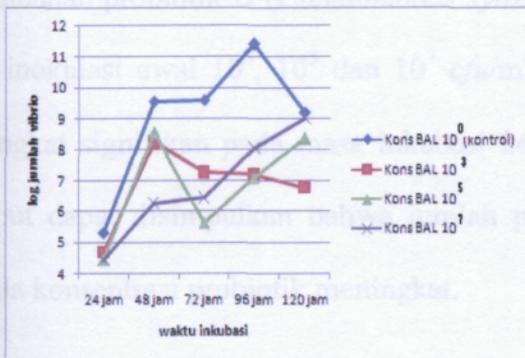
Setiap isolat BAL yang diuji menunjukkan kemampuan yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan *V. alginolyticus* pada inokulasi awal  $10^3$  cfu/ml (Gambar ). Penghambatan pertumbuhan yang terbaik ditunjukkan oleh isolat KSBU 12C, diikuti oleh isolat KSBU 5Da. Meskipun jumlah *V. alginolyticus* terus meningkat sampai waktu pengamatan 120 jam, jika dibandingkan dengan kontrol, penambahan BAL pada konsentrasi awal  $10^3$ ,  $10^5$  dan  $10^7$  cfu/ml dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen tersebut. Demikian pula dengan penambahan isolat KSBU 9 pada konsentrasi berbeda juga menunjukkan penurunan jumlah *V. alginolyticus*, namun tidak terlihat perbedaan antara perlakuan ketiga konsentrasi bakteri pada akhir pengamatan. Sementara pada isolat KSBU 11B, meskipun jumlah *V. alginolyticus* pada kontrol tetap tertinggi, namun tidak terlihat perbedaan antara ketiga perlakuan konsentrasi bakteri. Sedangkan pada perlakuan dengan isolat KSBU 5Aa dan KSBU 12B hampir tidak ada perbedaan antara kontrol dan perlakuan konsentrasi berbeda.



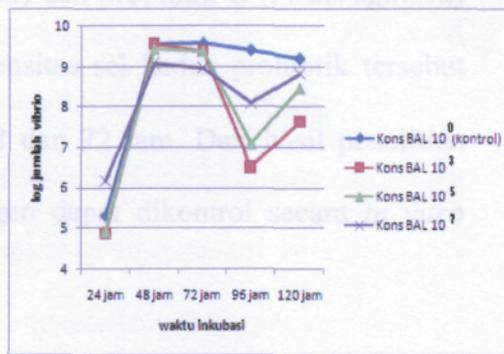
a. Isolat KSBU 5Da



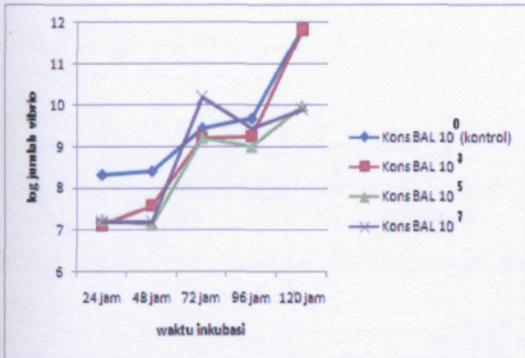
b. isolat KSBU 12C



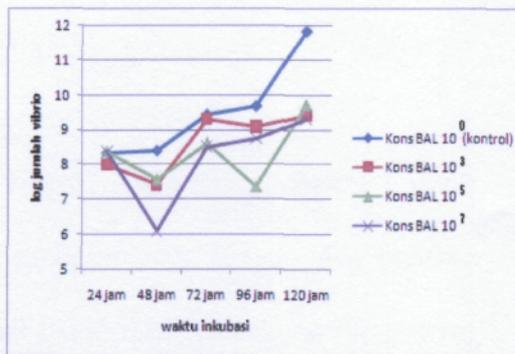
c. isolat KSBU 11B



d. isolat KSBU 5Aa



e. isolat KSBU 12B



f. isolat KSBU 9

Gambar 4. Perkembangan logaritma jumlah *V. alginolyticus* (inokulasi awal  $10^3$  cfu/ml) pada uji ko-kultur dengan konsentrasi awal BAL  $10^3$ ,  $10^5$  dan  $10^7$  cfu/ml selama 120 jam.

Hjelm *et al.* (2004) mendapatkan pengurangan jumlah *V. anguillarum* 90-11-37 dan *V. splendidus* (konsentrasi awal  $10^2$ - $10^3$  cfu/ml) setelah penambahan *Aerobacter* 27-4 (konsentrasi awal  $10^6$ - $10^7$  cfu/ml), pada hari pertama pengurangan terjadi sebanyak 1-2 unit logaritma, kemudian empat hari berikutnya terjadi pengurangan  $10^2$ - $10^3$  cfu/ml. Demikian pula, Hai *et al.* (2007) mendapatkan densitas sel *Vibrio* spp. tidak pernah melebihi level inokulasinya ( $10^3$  cfu/ml) dengan penambahan probiotik B (*Pseudomonas synxantha*) dan probiotik C (*P. aeruginosa*) pada inokulasi awal  $10^3$ ,  $10^5$  dan  $10^7$  cfu/ml, densitas sel kedua probiotik tersebut meningkat signifikan pada masa inkubasi 24, 48 dan 72 jam. Dari hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa jumlah patogen dapat dikontrol secara *in vitro* apabila konsentrasi probiotik meningkat.