

Metode Sederhana dan Cepat untuk Skrining Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin (*Antimicrobial peptide*) dari *Intestinum* Ikan dan Udang

Subagiyo^{1*}, Sebastian Margino², Triyanto², Ria Azizah Tri Nuraini¹, Wilis Ari Setyati¹, Rini Pramesti¹

¹Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Kampus Tembalang, Semarang 50275 Telp/Fax. 024-7474698

²Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada

JL. Flora, Bulaksumur, Caturtunggal, Kec. Depok, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281, Indonesia
Email : subagiyo.kelautan13@gmail.com

Abstrak

Kontribusi bakteri asam laktat dan bakteriosin dalam pengembangan keamanan makanan telah lama diketahui. Metode sederhana dan cepat diperlukan untuk menseleksi bakteri asam laktat yang mampu menghasilkan bakteriosin. Dua pendekatan telah dilakukan secara berurutan dalam metode ini. Pendekatan pertama adalah seleksi bakteri asam laktat menggunakan medium MRS agar yang diperkaya dengan CaCO₃. CaCO₃ digunakan sebagai indikator suatu koloni bakteri mampu menghasilkan asam. Pendekatan kedua adalah melakukan seleksi secara langsung terhadap koloni-koloni bakteri yang tumbuh pada medium seleksi pertama menggunakan teknik *overlay*. Medium MRS *soft agar* yang telah diinokulasi dengan bakteri *Pediococcus acidilactisi* di-*overlay*-kan ke atas koloni-koloni yang tumbuh di medium seleksi pertama. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni menunjukkan dihasilkannya bakteriosin. Koloni-koloni yang menghasilkan zona bening pada tahap pertama dan kedua selanjutnya diisolasi dan dimurnikan. Isolat ini adalah isolat bakteri penghasil asam dan bakteriosin. Pengujian atas metode ini terbukti efektif untuk program isolasi dan seleksi bakteri asam laktat penghasil bakteriosin dari *intestinum* ikan dan udang.

Kata kunci : metode, skrining, bakteri asam laktat, bakteriosin

PENDAHULUAN

Lingkungan strategis perikanan meliputi 3 hal yaitu (1)Ikan adalah sumber asupan protein dan gizi masyarakat, sehingga pengembangan perikanan berkontribusi dalam mendukung pemenuhan kebutuhan protein hewani yang lebih sehat dan mudah diperoleh, serta peningkatan kebutuhan gizi masyarakat (2)Ikan berkontribusi lebih dari 50% dari keseluruhan *intake* protein hewani, (3)Kecenderungan konsumsi ikan dunia semakin meningkat (semakin meningkatnya kesadaran global terhadap konsumsi jenis makanan yang lebih sehat dan semakin bertambahnya kelas menengah yang memiliki gaya hidup menyukai makanan berasal dari *seafood* (<http://www.bappenas.go.id>).

Aplikasi probiotik merupakan salah satu teknologi kesehatan berwawasan lingkungan karena tidak menimbulkan efek samping yang merugikan baik terhadap udang, lingkungan maupun konsumennya. Teknologi probiotik sekarang telah diterima oleh para praktisi tambak (Zhou & Wang, 2003), sehingga perhatian yang besar ditujukan untuk terus melakukan penelitian di bidang probiotik ini.

Keunggulan teknologi probiotik ini terutama karena prosesnya alami dan aman, memiliki banyak target efek menyehatkan yaitu diantaranya berinteraksi secara langsung terhadap mikroorganisme lain baik yang bersifat komensal maupun pathogenic. Hal ini menjadi dasar penting terkait dengan upaya pencegahan dan terapi infeksi serta restorasi keseimbangan mikroorganisme *intestinum*, memodulasi sistem pertahanan intestinal, menghasilkan enzim-enzim pencernaan ekstraseluler serta memproduksi senyawa-senyawa yang bermanfaat bagi inangnya (seperti vitamin dan asam lemak rantai pendek) serta aktivitas lain seperti detoksikasi senyawa beracun dan antinutrisi. Keunggulan teknologi probiotik ini telah direview Michael, *et al.* (2014), Akter, *et al.* (2016), Balcázar, *et al.* (2016), Zorriehzahra, *et al.* (2016). Sehingga peluang yang luas terbuka untuk melakukan kajian dan produksi probiotik untuk budidaya perikanan.

Bakteri asam laktat paling banyak dipilih untuk dikembangkan sebagai probiotik untuk menyehatkan udang didasarkan pada (1)bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme yang secara genetik adalah aman (memiliki status

genetically recognize as safe/GRAS) (2) dijumpai melimpah di dalam intestinum. (3) mampu hidup dan melekat di dalam sistem mukosa intestinum, (4) mampu berkompetisi dengan pathogen untuk reseptor pelekatan di epithelium intestinum, (5) mampu berkompetisi terhadap nutrient esensial, (6) menghasilkan asam organik, hidrogen peroksida dan bakteriosin yang bersifat antagonis terhadap pathogen, (7) menghasilkan produk bermanfaat lain seperti enzim ekstraseluler, (8) bersifat noninvasif, nonkarsinogenik dan nonpathogenik, (9) memiliki sejarah panjang digunakan sebagai starter produk makanan dan minuman serta probiotik untuk manusia dan ternak. Karakteristik fungsional BAL sebagai probiotik ini telah direview oleh Herich & Levkut (2002), Mattu & Chauhan (2013) dan Quinto, *et al.*, (2014)

MATERI DAN METODE

Sampel ikan dan udang (sumber probiotik dan bakteri penghasil bakteriosin)

Ikan yang digunakan sebagai sumber bakteri penghasil bakteriosin adalah jenis ikan yang masuk ke dalam kategori 7 jenis komoditas perikanan unggulan yaitu : ikan nila, lele, patin, gurame, kerapu, kakap dan bandeng, Udang yang digunakan sebagai sumber bakteri asam laktat penghasil bakteriosin adalah udang windu dan udang putih hasil tangkapan alam (tipe liar)

Bakteri indikator untuk seleksi bakteriosin

Bakteri indikator yang digunakan untuk seleksi produksi bakteriosin adalah *Pediococcus acidilactisi* LB 42. Bakteri ini diperoleh dari koleksi Pusat Antar Universitas pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Media

Media yang digunakan untuk isolasi dan seleksi bakteri asam laktat adalah media MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) (Ni, *et al.*, 2015 ; Khalil & Anwar, 2016) dengan komposisi Triptone (10.0 g/l), ekstrak khamir (5.0 g/l), Glukosa (20.0 g/l), K₂HPO₄ (2.0 g/l), sodium acetate (5.0 g/l), MgSO₄-7H₂O (0.2 g/l), MnSO₄-H₂O (0.05 g/l), ammonium sulfat (2.0 g/l), Tween 80 (1ml/l).

Pengambilan sampel intestinum

Sampel ikan dipingsankan dengan cara dimasukkan ke dalam wadah yang berisi air steril dan ditambah dengan minyak cengkih. Minyak cengkih dapat digunakan sebagai agensia anestesi untuk ikan (Nugraha & Insafitri, 2010),

sedangkan udang dipingsankan dengan cara dingin. Permukaan tubuh ikan dan udang disterilisasi menggunakan hipoklorit. Selanjutnya dilakukan pembedahan secara *aseptic* menggunakan peralatan seksio steril. Saluran pencernaan yang telah dipotong dan dipisahkan kemudian ditimbang. Satu gram saluran pencernaan diambil dan dicuci secara *aseptic* dengan air laut steril. Saluran pencernaan dihancurkan menggunakan mortar dalam lumpang porselin. Homogenat secara *aseptic* diambil dan disuspensikan ke dalam 9 mL air laut steril.

Isolasi bakteri intestinal

Homogenat *intestinum* dibuat seri pengenceran hingga 10⁻⁶. Penanaman bakteri dilakukan dengan cara *pour-plate*. Untuk isolasi bakteri asam laktat dituangkan media MRSA yang mengandung CaCO₃ dan diratakan, Inkubasi dilakukan secara aerob pada suhu 30 °C selama 2-3 hari. Koloni bakteri asam laktat ditunjukkan oleh koloni yang membentuk zona bening.

Seleksi bakteri penghasil bakteriosin secara langsung dengan metode overlay

Metode overlay yang digunakan untuk pengujian kemampuan menghasilkan bakteriosin menggunakan metode menurut de la Fuente-Salcido1, *et al.*, (2015). Disiapkan medium MRS *soft agar* yang telah diinokulasi dengan bakteri indikator LB 42. Sebanyak 15 mL medium MRS tersebut dituang ke atas koloni-koloni bakteri yang tumbuh dalam medium MRS agar + CaCO₃. Inkubasi pada suhu kamar selama 3x24 jam. Adanya aktivitas bakteriosin ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat.

Isolasi dan pemurnian BAL penghasil bakteriosin

Isolasi dilakukan pada semua koloni yang tumbuh di dalam zona bening yaitu zona yang menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri indikator LB 42. Selanjutnya dilakukan purifikasi menggunakan metode goresan pada medium MRS *agar* yang diperkaya dengan CaCO₃. Isolat murni BAL selanjutnya diuji aktivitas bakteriosinnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

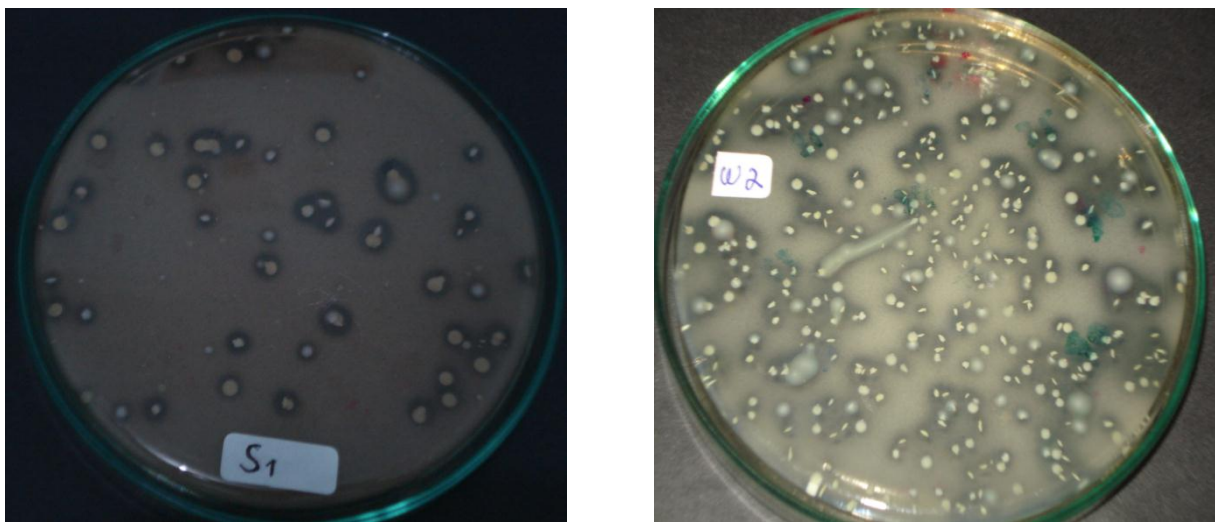
Penanaman suspensi bakteri dari intestinum ikan dan udang pada medium MRS *agar* yang diperkaya dengan CaCO₃ diperoleh koloni-koloni yang menunjukkan zona bening dan tidak

menunjukkan zona bening. Koloni yang menunjukkan zona bening adalah koloni yang menghasilkan asam (Gambar 1.). Asam yang disekresikan keluar dari koloni selanjutnya akan bereaksi dengan CaCO_3 yang ada di dalam medium MRS *agar* sehingga akan terbentuk zona bening di sekitar koloni. Koloni ini diprediksi sebagai koloni bakteri asam laktat.

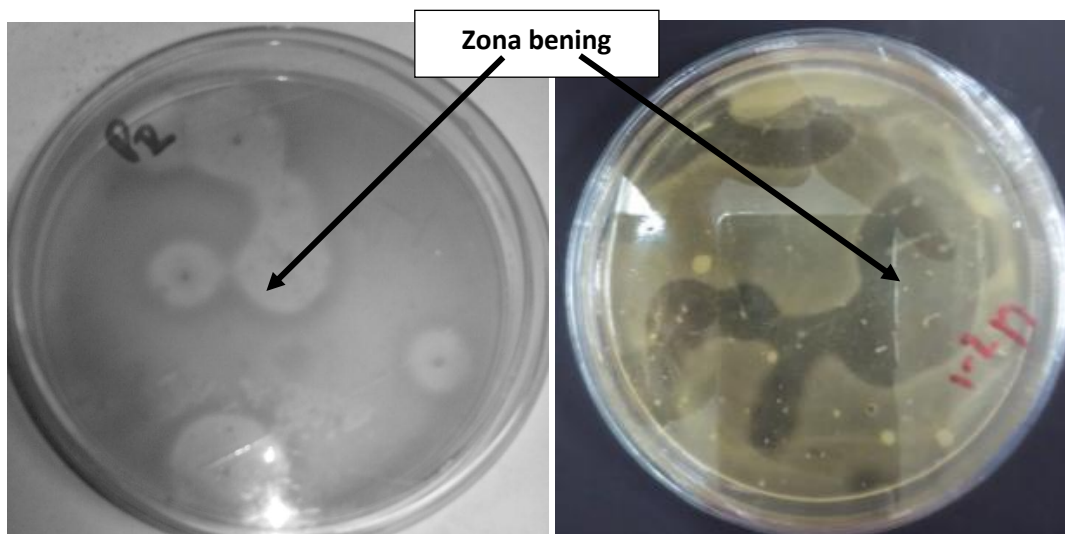
Pada deteksi isolat bakteri penghasil bakteriosin menggunakan metode non overlay, semua koloni yang menghasilkan zona bening diisolasi dan dimurnikan. Proses isolasi hingga pemurnian memerlukan waktu minimal 6 x 24 jam. Isolat-isolat yang telah dimurnikan

selanjutnya ditumbuhkan dalam medium MRS cair selama 24 jam. Jika isolat merupakan BAL penghasil bakteriosin maka bakteriosin disekresikan ke medium kultur. Sehingga pengujian adanya bakteriosin dilakukan pada supernatant kultur. Proses pengujian selama 24 jam. Total waktu yang diperlukan mulai dari isolasi hingga diperoleh informasi dihasilkannya atau tidak bakteriosin sekitar 8 x 24 jam.

Pada metode overlay, koloni-koloni yang menghasilkan zona bening pada medium MRS *agar* yang diperkaya dengan CaCO_3 dioverlay dengan medium MRS *agar* lunak yang telah diinokulasi dengan bakteri indikator LB-42.



Gambar 1. Hasil penanaman bakteri *intestinum* ikan dan udang pada medium MRS *agar* + CaCO_3 . Koloni yang menunjukkan zone bening adalah koloni bakteri penghasil asam



Gambar 2. Hasil *overlay* terhadap koloni yang tumbuh di dalam medium MRS *agar* + CaCO_3 . Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni adalah koloni yang menghasilkan bakteriosin

Inkubasi selama 24 jam. Hasil positif koloni menghasilkan bakteriosin ditunjukkan oleh terbentuknya zona benting di sekitar koloni (Gambar 2). Total waktu yang diperlukan dari isolasi hingga diperolehnya informasi adanya isolat yang mampu menghasilkan bakteriosin diperlukan waktu 4x 24 jam.

Berdasarkan perbandingan waktu yang diperlukan untuk deteksi isolat BAL mampu menghasilkan bakteriosin atau tidak mampu menghasilkan bakteriosin menunjukkan bahwa metode overlay lebih cepat daripada metode non overlay. Efektifitas metode overlay ini juga ditunjukkan oleh kenyataan bahwa tidak setiap kali melakukan isolasi akan diperoleh isolat-isolat yang mampu menghasilkan bakteriosin, sehingga dalam waktu yang lebih cepat dapat diketahui untuk segera mengambil sampel baru jika hasil overlay menunjukkan hasil yang negative.

Teknik overlay memberikan biaya yang lebih murah daripada teknik yang konvensional. Pada metode overlay penggunaan media hanya 2 yaitu media isolasi dan media untuk overlay, sedangkan pada metode non overlay penggunaan media terdiri dari media untuk isolasi, media penanaman (medium agar miring), medium pemurnian, medium produksi bakteriosin, medium pengujian aktivitas bakteriosin. Banyaknya medium bergantung pada jumlah isolat BAL yang diperoleh.

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa metode overlay ini merupakan metode sederhana dan cepat untuk skrining bakteri asam laktat penghasil bakteriosin.

Daftar Pustaka

- Akter, M.N., Parvez, I. & Patwary, Z.P. 2016, Beneficial effects of probiotics in aquaculture, *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(5):494-499
- Balcázar, J.L., Decamp, O., Vendrell, D., De Blas, I., & Ruiz-Zarzuola, I. 2006. Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 18(2):65-70
- de la Fuente-Salcido, N.M., Castañeda-Ramírez, J.C., García-Almendárez, B.E., Bideshi, D.K., Salcedo-Hernández, R., & Barboza-Corona, J.E. 2015, Isolation and characterization of bacteriocinogenic lactic bacteria from M-Tuba and Tepache, two traditional fermented beverages in México, *Food Sci. Nutr.* 3(5):434–442.
- Herich, R & Levkut, M., 2002, Lactic acid bacteria, probiotics and immune system, *Vet. Med.Czech*, 47(6):169–180
- Pembangunan Kelautan Dan Perikanan Dalam Prioritas Pembangunan Nasional 2015-2019. 2014. Kementerian PPN/Bappenas. Tersedia online : http://www.bappenas.go.id/files/2514/0374/8955/pembangunan_kelautan_dan_perikanan_dalam_prioritas_pembangunan_nasional_2015-2019_Jakarta_28_Januari_2014.pdf
- Khalil, I & Anwar, N., 2016, Isolation, Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Milk and Yoghurts. Research & Reviews: *Journal of Food and Dairy Technology*, 4(3)
- Mattu, B & Chauhan, A. 2013, Lactic Acid Bacteria and Its Use in Probiotics, *J Bioremed. Biodeg.* 2013, 4:8, DOI: 10.4172/2155-6199.1000e140
- Michael E. T, Amos S.O, & Hussaini L. T (2014) A Review on Probiotics Application in Aquaculture. *Fish Aquac. J.* 5:111. DOI: 10.4172/2150-3508.1000111
- Ni K., Wang Y., Li, D., Cai, Y., & Pang, H. 2015, Characterization, Identification and Application of Lactic Acid Bacteria Isolated from Forage Paddy Rice Silage. *PLoS ONE* 10(3):e0121967. DOI: 10.1371/journal.pone.0121967
- Nugraha, W. A., & Insafitri. 2010, Perbandingan kecepatan pembiusan dan recovery ikan hias Zebra Jakarta menggunakan sianida dan minyak cengkeh, *Jurnal Kelautan* 3(2):168-172
- Quinto, E.J., Jiménez, P., Carol, I., Tejero, J., Mateo, J., & Girbés, T. 2014, Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review, *Food and Nutrition Sciences*, 5:1765-1775
- Zorriehzahra, M. J., Delshad, S.T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K. & Lazado, C.C. 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review, *Veterinary Quarterly*, 36(4):228-241, DOI: 10.1080/01652176.2016.1172132