PENDAHULUAN

Latar Belakang

Produktivitas tambak udang di Indonesia mengalami penurunan akibat serangan penyakit vibriosis yang disebabkan oleh bakteri patogen Vibrio harveyi (Marjono et al. 2002). Selain penurunan produksi, masalah lain yang perlu diperhatikan adalah kualitas produk udang siap ekspor.

Syrar mutu produk udang siap ekspor diantaranya adalah bebas dari cemaran mikrobi patogen (Escherichia coli dan Staphylococcus aureus) serta residu antibiotik (DKP RI 2005; Morriarty 1999). Walaupun sudah diluar, aplikasi antibiotik merupakan cara yang umum digunakan oleh petambak untuk mencegah penyakit vibriosis pada udang.

Penambahan musuh alami merupakan alternatif yang bisa digunakan untuk mengatasi masalah penggunaan antibiotic (Goevauny et al. 2007). Dari hasil penelitian pendahuluan diketahui bakteri Bacillus sp. mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen pada udang (Lestari 2007). Bacillus sp. merupakan bakteri Gram positif yang mampu menghasilkan berbagai jenis zat antimikroba, diantaranya ialah bakteriosin. Zat antimikroba tersebut memiliki efek bakteriosida atau bakteriostatik (Verschueren et al. 2000).

Bagi jenis Bacillus sp. telah diketahui menghasilkan bakteriosin dengan karakter yang beragam. Bakteriosin yang dihasilkan oleh B. coagulans L4 mempunyai berat molekul (BM) 3–4 kDa, stabil terhadap panas 50 °C selama 90 menit, dan stabil pada pH 4-8 (Hyronimus et al. 1998). Bacillus amyloliquefaciens menghasilkan bakteriosin dengan BM 5 kDa, stabil terhadap panas 100 °C selama 60 menit, dan stabil pada pH 2-8 (Lisboa et al. 2006), sedangkan bakteriosin yang dihasilkan oleh B.licheniformis mempunyai BM 2 kDa, stabil terhadap panas 100 °C, dan stabil pada kisaran pH yang luas (Martini et al. 2002).

Bacillus sp. LTW 54 merupakan salah satu bakteri koleksi Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi FMIPA yang diketahui memiliki aktivitas penghambatan terhadap V. harveyi dan E. coli (Lestari 2007). Namun karakteristik dari zat antimikroba yang dihasilkan belum diketahui. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui karakterisasi zat antimikroba yang dihasilkan oleh isolat tersebut.

Tujuan

Penelitian ini bertujuan mengkarakterisasi zat antimikroba dari isolat Bacillus sp. LTW 54 asal tambak udang.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Februari sampai dengan Juli 2008 di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi FMIPA IPB.

Bakteri dan Pengkulturannya

Bacillus sp. LTW 54 dan ketiga bakteri uji ditumbuhkan pada media NB/NA yang mengandung 2% NaCl dan diinkubasi pada suhu ruang (29-31 °C) di atas rotary orbital shaker (100 rpm) selama waktu tertentu.

Uji Verifikasi Aktivitas Penghambatan

Sebanyak 150 μl kultur bakteri uji umur 24 jam disebarkan di atas media NA + 2% NaCl agar cawan. Koloni Bacillus sp. LTW 54 berumur dua hari ditotol di atas permukaan media agar cawan menggunakan tusuk gigi, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Aktivitas penghambatan akan terlihat dengan terbentuknya zona bening disekeliling koloni Bacillus sp. LTW 54. Besarnya indeks penghambatan Bacillus sp. LTW 54 terhadap bakteri uji dihitung dengan cara:

\[
\text{Indeks Penghambatan (IP)} = \frac{A-B}{B} 
\]

Keterangan :
A = Diameter zona bening
B = Diameter koloni/cakram

Metode Cross-streak

Bacillus sp. LTW 54 umur 24 jam digores tegak lurus di atas permukaan media NA + 2% NaCl, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya bakteri uji umur 24 jam digores tegak lurus terhadap goresan Bacillus sp. LTW 54. Setelah itu dilakukan pengukuran jarak antara kultur Bacillus sp. LTW 54 dengan bakteri uji yang digunakan.

Penentuan Waktu Produksi Zat Antimikroba

Kultur Bacillus sp. LTW 54 umur 24 jam diinkubasikan ke dalam 50 ml media NB + 2% NaCl dan diinkubasi selama 24 jam. Sebanyak 2 ml kultur cair tersebut digunakan sebagai inokulan untuk 150 ml media yang sama lalu diinkubasi selama 48 jam. Setiap 6
jam dilakukan pengambilan 1 ml sampel untuk pengukuran turbiditas sel pada panjang gelombang 620 nm. Sampel disentrifugasi pada 5040 g selama 15 menit. Supernatan dan massa sel dijiu aktivitas penghambatannya terhadap bakteri uji.

Massa sel dijiu dengan menotolkan secara langsung ke atas permukaan media agar cawan yang telah disetar dengan bakteri uji, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Supernatan juga dijiu aktivitas penghambatannya menggunakan agar-disk diffusion assay (Lisboa et al. 2006). Sebanyak 25 μl supernatan diteteskan di atas cakram kertas berukuran 6 mm, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C.

Pengendapan Zat Antimikroba
Satu lup Bacillus sp. LTW 54 diinkulasi ke dalam 100 ml media NB + 2% NaCl dan diinkubasi selama 24 jam di atas rotary orbital shaker. Sebanyak 10 ml kultur tersebut digunakan sebagai inokulasi untuk 500 ml media cair yang baru lalu diinkubasi dengan car yang sama. Setelah 24 jam inkubasi kultur tersebut disentrifugasi pada 4500 g selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh diendapkan secara bertahap menggunakan aseton dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, dan 60%. Endapan protein dipisahkan dari cairan kultur dengan cara sentrifugasi pada 4500 g selama 30 menit pada suhu 4°C.

Endapan protein yang diperoleh dikeringkan kemudian dilarutkan kembali menggunakan buffer fosfat 0.1 M (pH 7). Larutan protein yang diperoleh dari masing-masing tingkat pengendapan dijiu aktivitas penghambatannya menggunakan agar-disk diffusion assay.

Pengukuran Konsentrasi Protein
Larutan protein yang memiliki aktivitas penghambatan paling besar pada agar-disk diffusion assay diukur konsentrasi proteinnya menggunakan metode Bradford (Bradford 1976) dengan teknik microassay. Sebanyak 400 μl sampel direaksikan dengan 4 ml reagen Bradford (Lampiran 1), kemudian diinkubasi selama 15 menit. Lalu absorbansi campuran tersebut diukur pada panjang gelombang 595 nm. Sebagai blanko digunakan 400 μl akuades steril yang ditambah dengan reagen Bradford. Sebagai standar digunakan larutan Bovine Serum Albumin (BSA) dengan konsentrasi 0.01-0.1 mg/ml dari stok BSA 1 mg/ml.

Uji Stabilitas Panas terhadap Protein Hasil Pengendapan
Sebanyak 1 ml larutan protein hasil pengendapan dimasukkan ke dalam tabung 1.5 ml lalu dimasukkan ke dalam water bath pada suhu 50 dan 100 °C selama 10 dan 20 menit. Selanjutnya sampel didinginkan kembali pada suhu ruang dan dijiu aktivitas penghambatannya menggunakan agar-disk diffusion assay.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil
Aktivitas Penghambatan Bacillus sp. LTW 54 terhadap Pertumbuhan Bakteri Uji pada Uji Verifikasi
Bacillus sp. LTW 54 dapat menghambat pertumbuhan bakteri V. harveyi, E. coli, dan S. aureus dengan IP tertinggi sebesar 2.6 terhadap S. aureus. Indeks penghambatan terhadap E. coli adalah 0.8 sedangkan terhadap V. harveyi 0.9 (Gambar 1; Tabel 1).

Tabel 1 Indeks penghambatan Bacillus sp. LTW 54 terhadap pertumbuhan bakteri uji pada uji verifikasi

<table>
<thead>
<tr>
<th>Bakteri uji</th>
<th>Ø koloni (mm)</th>
<th>Ø zona bening (mm)</th>
<th>IP</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Staphylococcus aureus</td>
<td>7</td>
<td>25.3</td>
<td>2.6</td>
</tr>
<tr>
<td>Escherichia coli</td>
<td>3.7</td>
<td>6.7</td>
<td>0.8</td>
</tr>
<tr>
<td>Vibrio harveyi</td>
<td>2.3</td>
<td>4.3</td>
<td>0.9</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Ket. IP : Indeks Penghambatan, Ø : Diameter