

**PENGUNAAN BAKTERI ASAM LAKTAT *Lactobacillus plantarum*
SEBAGAI PENGHAMBAT BAKTERI *Vibrio harveyi* SECARA IN-VITRO**

SKRIPSI

**MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
BUDIDAYA PERAIRAN**

Oleh:

**KURNIA KARTIKA SARI
NIM. 0510850038**



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

MALANG

2010

**PENGUNAAN BAKTERI ASAM LAKTAT *Lactobacillus plantarum*
SEBAGAI PENGHAMBAT BAKTERI *Vibrio harveyi* SECARA IN-VITRO**

Oleh :

KURNIA KARTIKA SARI
0510850038

MENGETAHUI,

KETUA JURUSAN MSP

MENYETUJUI,

DOSEN PEMBIMBING I

Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, MS

NIP : 196003221 198601 1 011

Prof. Dr. Ir. H ARIEF PRAJITNO, MS

NIP : 19550213 198403 1 001

DOSEN PEMBIMBING II

Ir. ELLANA SANOESI, MP

NIP : 19630924 199803 2 002

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji pada Proses Isolasi dan Identifikasi Bakteri
Lactobacillus plantarum

Hasil Pengamatan Makroskopis

Parameter Pengamatan	Hasil
Bentuk Koloni	Bulat
Ukuran Koloni	0,5 mm
Warna Koloni	Krem
Elevasi Koloni	Cembung
Konsistensi koloni	Non mukoid

Hasil Pengamatan Mikroskopis

Parameter Pengamatan	Hasil
Bentuk sel	Batang
Ukuran sel	0,9 X 3 μ m
Sifat Gram	Gram Positif

Lampiran 1. (Lanjutan)**Hasil Uji Fementasi gula-gula**

Arabinosa	NEGATIF
Fruktosa	POSITIF
Glukosa	POSITIF
Laktosa	POSITIF
Maltosa	POSITIF
Mannitol	POSITIF
Raffinosa	POSITIF
Rhamnosa	NEGATIF
Salicin	POSITIF
Sorbitol	POSITIF
Sukrosa	POSITIF
Xylosa	POSITIF

Hasil Uji Pertumbuhan NaCl

Kadar NaCl (%)	Hasil
3%	POSITIF
4%	POSITIF
6,5%	POSITIF
10%	POSITIF

Lampiran 2. Data Perhitungan Zona Hambat Bakteri *Vibrio harveyi*

A. Diameter Daerah Hambatan pada Masing-Masing Perlakuan

Perlakuan (Jam ke-)	Diameter Daerah Hambatan (mm)			Total	Rata-rata
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
0	6,00	6,01	6,01	18,02	6,01
4	6,03	6,05	6,02	18,10	6,03
8	6,11	6,08	6,08	18,27	6,09
12	6,15	6,12	6,14	18,41	6,14
16	6,21	6,20	6,23	18,64	6,21
20	15,28	15,27	15,30	45,85	15,28
24	19,23	19,38	19,23	57,84	19,28

B. Perhitungan Jumlah Kuadrat

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{(195,13)^2}{21}$$

$$= \frac{38075,71}{21}$$

$$= 1813,13$$

$$\begin{aligned} \text{JK Total} &= (6,00)^2 + (6,01)^2 + (6,01)^2 + (6,03)^2 + (6,05)^2 + (6,02)^2 + \\ &\quad (6,11)^2 + (6,08)^2 + (6,08)^2 + (6,15)^2 + (6,12)^2 + (6,14)^2 + \\ &\quad (6,21)^2 + (6,20)^2 + (6,23)^2 + (15,28)^2 + (15,27)^2 + (15,30)^2 + \\ &\quad (19,23)^2 + (19,38)^2 + (19,23)^2 - 1813,13 \\ &= 2373,39 - 1813,13 \\ &= 560,26 \end{aligned}$$

$$\text{JK Perlakuan} =$$

$$\frac{(18,02)^2 + (18,1)^2 + (18,27)^2 + (18,41)^2 + (18,64)^2 + (45,85)^2 + (57,84)^2}{3} - 1813,13$$

$$= \frac{7120,16}{3} - 1813,13$$

$$= 2373,38 - 1813,13$$

$$= 560,25$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK Acak} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\
 &= 560,26 - 560,25 \\
 &= 0,01
 \end{aligned}$$

C. Analisa Sidik Ragam

Sumber keragaman	Db	JK	KT	F Hitung	F 5 %	F 1 %
Perlakuan	6	560,25	93,375	133392,85**	2,85	4,46
Acak	14	0,01	0,0007			
Total	20					

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata

Karena $F \text{ tabel } 5\% < F \text{ hitung } > F \text{ tabel } 1\%$, maka perlakuan pemanenan *L. Plantarum* pada jam yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap zona hambat bakteri *V. harveyi*.

D. Uji BNT untuk 5% dan 1%

$$\begin{aligned}
 \text{SED} &= \sqrt{\frac{2 \text{KT Acak}}{\text{ulangan}}} \\
 &= \sqrt{\frac{2 \times 0,0007}{3}} \\
 &= 0,022
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } 5\% &= t \text{ } 5\% \text{ (db acak)} \times \text{SED} \\
 &= 1,761 \times 0,022 \\
 &= 0,038
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } 1\% &= t \text{ } 1\% \text{ (db acak)} \times \text{SED} \\
 &= 2,624 \times 0,022 \\
 &= 0,057
 \end{aligned}$$

E. Tabel Uji Beda Nyata Terkecil

Rataan	A 6,01	B 6,03	C 6,09	D 6,14	E 6,21	F 15,28	G 19,28	Notasi
A 6,01	-							a
B 6,03	0,02 ^{ns}	-						a
C 6,09	0,08**	0,06**	-					b
D 6,14	0,13**	0,11**	0,05*	-				c
E 6,21	0,2**	0,18**	0,12**	0,07**	-			d
F 15,28	9,27**	9,25**	9,19**	9,14**	9,07**	-		e
G 19,28	13,27**	13,25**	13,19**	13,14**	13,07**	4**	-	f

F. Persamaan Regresi Linier dengan Rumus $Y = b_0 + b_1$

x	y	x.y	x ²	y ²	(x-x _̄)	(y-y _̄)	(x-x _̄) ²	(y-y _̄) ²	(x-x _̄)(y-y _̄)	[(x-x _̄)(y-y _̄)] ²
0	6,00	0	0	36	-12	-3,29	144	10,82	39,48	1558,67
0	6,01	0	0	36,12	-12	-3,28	144	10,76	39,36	1549,21
0	6,01	0	0	36,12	-12	-3,28	144	10,76	39,36	1549,21
4	6,03	24,12	16	36,36	-8	-3,26	64	10,63	26,08	680,17
4	6,05	24,20	16	36,60	-8	-3,24	64	10,49	25,92	671,85
4	6,02	24,08	16	36,24	-8	-3,27	64	10,69	26,16	684,35
8	6,11	48,88	64	37,33	-4	-3,18	16	10,11	12,72	161,79
8	6,08	48,64	64	36,97	-4	-3,21	16	10,30	12,84	164,87
8	6,08	48,64	64	36,97	-4	-3,21	16	10,30	12,84	164,87
12	6,15	73,80	144	37,82	0	-3,14	0	9,86	0	0
12	6,12	73,44	144	37,45	0	-3,17	0	10,05	0	0
12	6,14	73,68	144	37,69	0	-3,15	0	9,92	0	0
16	6,21	99,36	256	38,56	4	-3,08	16	9,49	-12,32	151,78
16	6,20	99,20	256	38,44	4	-3,09	16	9,55	-12,36	152,77
16	6,23	99,68	256	38,81	4	-3,06	16	9,36	-12,24	149,82
20	15,28	305,6	400	233,48	8	5,99	64	35,88	-47,92	2296,33
20	15,27	305,4	400	233,17	8	5,98	64	35,76	47,84	2288,67
20	15,30	306	400	234,09	8	6,01	64	36,12	48,08	2311,69
24	19,23	461,52	576	369,79	12	9,94	144	98,80	119,28	14227,72
24	19,38	465,12	576	375,58	12	10,09	144	101,81	121,08	14660,37
24	19,23	461,52	576	369,79	12	9,94	144	98,80	119,28	14227,72
$\Sigma =$ 252	$\Sigma y =$ 195,13	$\Sigma x.y =$ 3042,88	$\Sigma x^2 =$ 4368				$\Sigma =$ 1344	$\Sigma =$ 560,26	$\Sigma =$ 701,32	$\Sigma =$ 57651,86
$\bar{x} =$ 12	$\bar{y} =$ 9,29									

$$b_1 = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$= \frac{3042,88 - \frac{252 * 195,13}{21}}{4368 - \frac{(252)^2}{21}}$$

$$= 0,52$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x}$$

$$= 9,29 - (0,52 \times 12)$$

$$= 9,29 - 6,24$$

$$= 3,05$$

Sehingga diperoleh persamaan :

$$Y = b_0 + b_1 x$$

$$Y = 3,05 + 0,52x$$

$$R^2 = \frac{b_1 \sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (y - \bar{y})^2}$$

$$R^2 = \frac{0,52(701,32)}{560,26}$$

$$R^2 = \frac{364,6864}{560,26}$$

$$R^2 = 0,6509 \longrightarrow r = 0,806$$

Jadi, untuk

$$X = 0 \longrightarrow Y = 3,05 + 0,52 (0) = 3,05$$

$$X = 4 \longrightarrow Y = 3,05 + 0,52 (4) = 5,13$$

$$X = 8 \longrightarrow Y = 3,05 + 0,52 (8) = 7,21$$

$$X = 12 \longrightarrow Y = 3,05 + 0,52 (12) = 9,29$$

$$X = 16 \longrightarrow Y = 3,05 + 0,52 (16) = 11,37$$

$$X = 20 \longrightarrow Y = 3,05 + 0,52 (20) = 13,45$$

$$X = 24 \longrightarrow Y = 3,05 + 0,52 (24) = 15,53$$



Lampiran 3. Hasil Uji Cakram



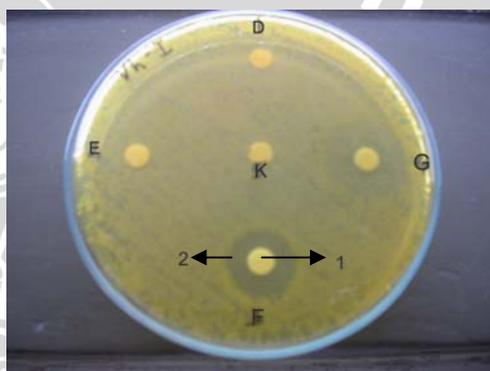
Hasil Ulangan 1



Hasil Ulangan 2



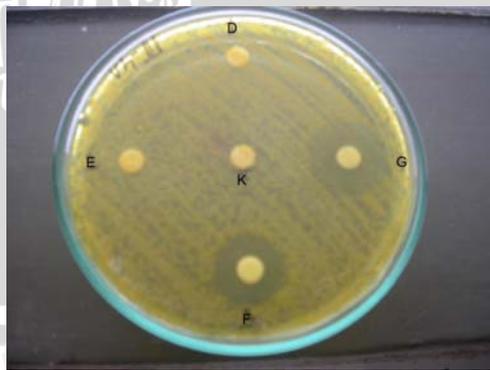
Hasil Ulangan 3



Hasil Ulangan 1



Hasil Ulangan 2



Hasil Ulangan 3



Keterangan :

- A = Pemberian *Lactobacillus plantarum* dengan pemanenan pada jam ke-0
- B = Pemberian *Lactobacillus plantarum* dengan pemanenan pada jam ke-4
- C = Pemberian *Lactobacillus plantarum* dengan pemanenan pada jam ke-8
- D = Pemberian *Lactobacillus plantarum* dengan pemanenan pada jam ke-12
- E = Pemberian *Lactobacillus plantarum* dengan pemanenan pada jam ke-16
- F = Pemberian *Lactobacillus plantarum* dengan pemanenan pada jam ke-20
- G = Pemberian *Lactobacillus plantarum* dengan pemanenan pada jam ke-24
- 1 = Kertas Cakram
- 2 = Zona Bening

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena dengan rahmat dan hidayah-Nya penulisan skripsi ini dapat terselesaikan. Penyusunan skripsi merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Atas terselesainya penulisan skripsi ini, penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

- Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku Dosen Pembimbing I
- Ibu Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku Dosen Pembimbing II
- Bapak, Ibu, kakak dan adik atas kasih sayang, doa, semangat dan dukungan yang telah diberikan
- Teman – teman, atas semangat bantuannya dan informasi yang diberikan serta semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.

Akhirnya penulis berharap semoga laporan ini dapat bermanfaat dan memberikan informasi bagi pihak yang berminat dan memerlukannya.

Malang, Juni 2010

Penulis

Kurnia Kartika Sari. Penggunaan Bakteri Asam Laktat *Lactobaccillus plantarum* Sebagai Penghambat Bakteri *Vibrio harveyi* Secara In-Vitro (di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. ARIEF PRAJITNO, MS dan Ir. ELLANA SANOESI, MP).

Pada saat permintaan udang dunia terus meningkat, menurut data dari Dirjen Perikanan Budidaya 2006 terjadi penurunan produksi udang di Indonesia dari 133,836 ton tahun 2003, dan 127,119 ton tahun 2004 menjadi 100,000 ton pada tahun 2005. Penurunan produksi udang di Indonesia mulai tahun 2003 hingga sekarang terutama disebabkan oleh infeksi virus akibat buruknya kondisi perairan sehingga terjadi kegagalan panen di tambak. Salah satu hal yang perlu dilakukan dalam meningkatkan hasil produksi budidaya tambak udang adalah dengan cara mengatasi kendala-kendala yang dapat menghambat kelancaran proses produksi budidaya udang, diantaranya adalah mengatasi virus dan bakteri yang dapat mengganggu proses pertumbuhan dan perkembangan udang di tambak.

Bakteri asam laktat merupakan jenis bakteri yang mampu menghasilkan asam laktat, hidrogen peroksida, antimikroba dan hasil metabolisme lain yang memberikan pengaruh positif. Isolasi bakteri asam laktat dilakukan untuk menghasilkan antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Dengan mengetahui aktivitas antimikroba terhadap bakteri tertentu sangat penting peranannya dalam mencegah terkontaminasinya oleh bakteri, khususnya bakteri patogen yang berbahaya sehingga dapat menimbulkan penyakit pada hewan.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, pada tanggal 12 Oktober 2009 – 16 November 2009. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan bakteri asam laktat (*L. plantarum*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* secara *in vitro*. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi awal dalam upaya alternatif penanggulangan penyakit vibriosis khususnya yang disebabkan oleh bakteri *V. harveyi*.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen, sedangkan rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan menggunakan tujuh perlakuan dan tiga kali ulangan. Perlakuan tersebut adalah dengan pemanenan *L. plantarum* pada jam yang berbeda yaitu jam ke-0, ke-4, ke-8, ke-12, ke-16, ke-20, dan jam ke-24. Sebagai parameter utama dalam penelitian ini adalah diameter daerah hambatan *L. plantarum* terhadap pertumbuhan bakteri *V. harveyi*, sedangkan parameter penunjang dalam penelitian adalah pH media dan suhu inkubator.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *L. plantarum* dengan pemanenan pada jam yang berbeda memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap lebar daerah hambatan yang terbentuk. Rata-rata diameter hambatan untuk perlakuan jam ke-0 adalah 6,01 mm; perlakuan jam ke-4 rata-rata diameter daerah hambatan sebesar 6,03 mm; perlakuan jam ke-8 rata-ratanya adalah 6,09 mm; perlakuan jam ke-12 rata-ratanya yaitu 6,14 mm; perlakuan jam ke-16 rata-rata diameter hambatan sebesar 6,21 mm, perlakuan jam ke-20 rata-rata diameter daerah hambatan sebesar 15,28 mm dan perlakuan jam ke-24 rata-rata diameter daerah hambatan sebesar 19,28 mm. Hubungan antara Pemanenan *L. plantarum* pada jam yang berbeda dengan diameter daerah hambatan berbentuk regresi linier, dengan persamaan $Y = 0,0026 x + 0,1027$ dan nilai koefisien korelasi r sebesar 0,999. *L. plantarum* bersifat bakteriostatik yaitu hanya menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*

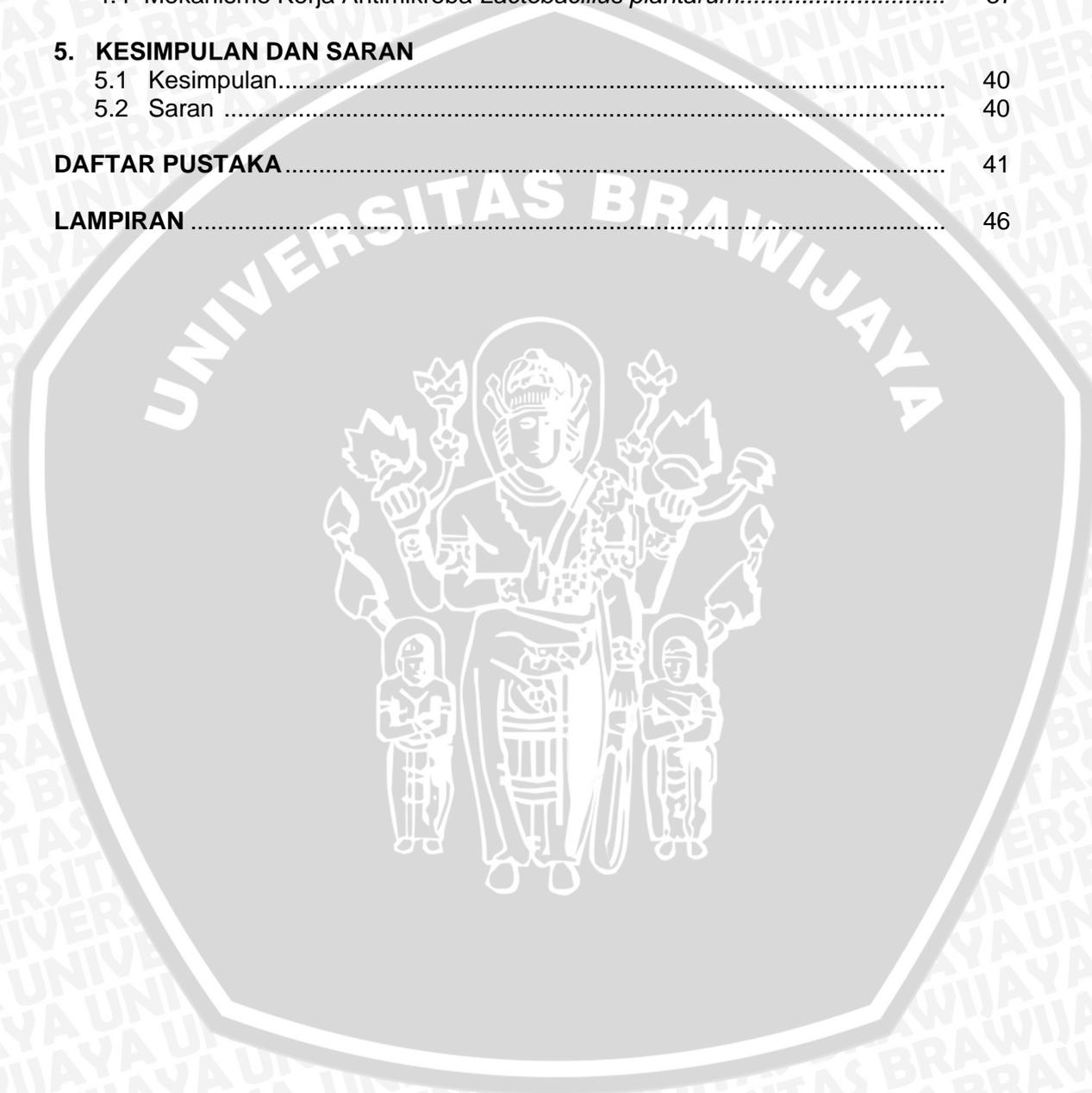
Saran yang dapat diberikan dari hasil penelitian ini, yaitu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian Bakteri Asam Laktat *L. plantarum* dengan pemanenan pada jam yang berbeda terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *V. harvey* secara *in vivo*.



DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Kegunaan Penelitian	6
1.5 Hipotesis	6
1.6 Tempat dan Waktu	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Bakteri <i>Vibrio</i> sp.	7
2.1.1 Klasifikasi	7
2.1.2 Karakteristik	7
2.1.3 Patogenitas Bakteri <i>Vibrio</i>	8
2.1.4 Habitat	10
2.1.5 Infeksi dan Tanda - Tanda Serangan	10
2.2 <i>Lactobacillus plantarum</i>	11
2.2.1 Klasifikasi	11
2.2.2 Karakteristik	11
2.2.3 Habitat	12
2.2.4 Kandungan Kimia	13
2.2.5 Mekanisme Kerja Antimikroba	13
2.3 Uji Efektifitas Anti Bakteri Secara In Vitro	15
2.3.1 Cara Cakram	15
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	16
3.1.1 Bahan	16
3.1.2 Alat	16
3.2 Metode dan Rancangan Penelitian	17
3.2.1 Metode Penelitian	17
3.2.2 Rancangan Penelitian	18
3.3 Prosedur Penelitian	20
3.3.1 Persiapan	20
3.3.2 Pelaksanaan	25
3.4 Parameter Uji	26

3.5 Analisa Data.....	26
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	28
4.2 Kultur Murni <i>Vibrio harveyi</i>	29
4.3 Uji Cakram	31
4.4 Mekanisme Kerja Antimikroba <i>Lactobacillus plantarum</i>	37
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	40
5.2 Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	46



1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang putih (*Litopenaeus vannamei*) merupakan spesies introduksi yang dibudidayakan di Indonesia. Udang putih yang dikenal masyarakat dengan vanname ini berasal dari perairan Amerika Tengah. Di Indonesia, udang putih baru diintroduksi dan dibudidayakan mulai awal tahun 2000 dengan menunjukkan hasil yang menggembirakan. Masuknya udang putih ini telah menggairahkan kembali usaha pertambakan Indonesia yang mengalami kegagalan budidaya akibat penyakit, terutama bintik putih (*white spot*). Udang putih mempunyai beberapa keunggulan dibanding spesies udang lainnya, antara lain: tingkat kelulus hidupan tinggi, ketersediaan benur yang berkualitas, kepadatan tebar tinggi, tahan penyakit dan konversi pakan rendah (Supono, 2009).

Saat permintaan udang dunia terus meningkat, menurut data dari Dirjen Perikanan Budidaya 2006 terjadi penurunan produksi udang di Indonesia dari 133,836 ton tahun 2003, dan 127,119 ton tahun 2004 menjadi 100,000 ton pada tahun 2005. Penurunan produksi udang di Indonesia mulai tahun 2003 hingga sekarang terutama disebabkan oleh infeksi virus akibat buruknya kondisi perairan sehingga terjadi kegagalan panen di tambak. Salah satu hal yang perlu dilakukan dalam meningkatkan hasil produksi budidaya tambak udang dengan cara mengatasi kendala-kendala yang dapat menghambat kelancaran proses produksi budidaya udang, diantaranya adalah mengatasi virus dan bakteri yang dapat mengganggu proses pertumbuhan dan perkembangan udang di tambak (Agung, 2007).

Penyakit dapat didefinisikan sebagai segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan suatu fungsi atau struktur dari alat tubuh atau sebagian alat tubuh, baik

secara langsung maupun tidak langsung (Kordi, 2004). Menurut Samsundari (2005), penyakit yang menyerang tidak datang begitu saja, melainkan melalui proses hubungan antara tiga faktor, yaitu kondisi lingkungan (kondisi dalam air), kondisi inang, dan adanya jasad patogen (jasad penyakit).

Beberapa penyakit pada udang saat ini sudah mulai meresahkan masyarakat pembudidaya udang, misalnya penyakit white spot pada udang putih atau penyakit vibriosis pada udang windu. *Vibrio* merupakan bakteri penyebab penyakit pada udang yang dapat menyebabkan penyakit pada bagian-bagian tubuh udang baik di luar maupun di dalam tubuh. Udang yang terkena penyakit di bagian luar oleh bakteri tersebut pada umumnya kulit menjadi keropos atau lunak. Penyakit ini disebabkan oleh spesies-spesies dari jenis *vibrio* yang berbeda-beda, dan setiap spesies *vibrio* memiliki intensitas parasitas yang berbeda-beda. Penularan penyakit vibriosis ini tergolong cepat sehingga dapat meningkatkan nilai mortalitas pada suatu tambak. Bakteri ini dapat menyebabkan kematian larva udang sampai 100% dalam waktu 1-2 hari (Agung, 2007).

Untuk menanggulangi penyakit ini pengelola panti benih pada umumnya menggunakan antibiotik untuk menanggulangi bakteri bercahaya (*V. harveyi*) tetapi dalam penggunaannya seringkali tidak terkontrol sehingga hasil yang diperoleh tidak efektif. Tindakan demikian dapat meningkatkan resistensi bakteri terhadap antibiotik serta mencemari lingkungan perairan yang pada gilirannya akan dapat menimbulkan masalah baru bagi usaha perbenihan (Taufik *et al*, 1996). Selain itu, dapat menimbulkan masalah residu obat pada udang sehingga berdampak pada penolakan pasar udang tersebut karena membahayakan konsumen (Prajitno, 2007).

Beberapa lembaga perikanan sudah mulai mencari cara untuk pencegahan dan pengobatan udang dari serangan vibriosis. Salah satu pengendalian bakteri

patogen adalah mempertemukan dengan bakteri antagonisnya. Vershere *et al.* (2000) cit. Isnansetyo (2005) dalam Rozi, (2008) mengemukakan bahwa bakteri antagonis dalam perannya sebagai agen pengendalian hayati melalui mekanisme menghasilkan senyawa penghambat pertumbuhan patogen, kompetisi pemanfaatan senyawa tertentu atau kompetisi tempat menempel, mempertinggi respon imun inang, meningkatkan kualitas air dan adanya interaksi dengan fitoplankton.

Pengendalian hayati adalah penggunaan musuh alamiah untuk mengurangi kerusakan yang ditimbulkan oleh organisme yang berbahaya atau pengaturan populasi penyakit oleh musuh alamiahnya. Populasi bakteri *V. harveyi* di lingkungan pemeliharaan udang dapat ditekan dengan cara mengintroduksi bakteri tertentu yang diisolasi dari perairan laut di sekitar tambak atau pembenihan udang. *Lactobacillus spp.* dilaporkan efektif menghambat vibriosis, *Bacillus spp.*, dan *Staphylococcus spp.* yang berasal dari tambak mampu menekan bakteri *Vibrio*.

Lactobacillus termasuk golongan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat merupakan jenis bakteri yang mampu menghasilkan asam laktat, hidrogen peroksida, antimikroba dan hasil metabolisme lain yang memberikan pengaruh positif (Ali, 2008). Bakteri Asam Laktat (BAL) dikelompokkan ke dalam beberapa genus antara lain *Streptococcus* (termasuk *Lactococcus*), *Leuconostoc*, *Pediococcus lactobacillus*. Sifat yang menguntungkan dari bakteri *Lactobacillus* dalam bentuk probiotik adalah dapat digunakan untuk mendukung peningkatan kesehatan. *Lactobacillus* menghasilkan anti bakteri. Beberapa substansi antimikroba yang dihasilkan bakteri probiotik, misalnya *L. acidophilus* menghasilkan acidotin, acidophilin, bacteriocin, lactocidin, *L. bulgaricus* (bulgarican), *L. plantarum* (lactolin), *L. brevis* (lactobullin, lactobrevin), dan *L. reuteri* (rauterin) Filtrat *Lactobacillus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*,

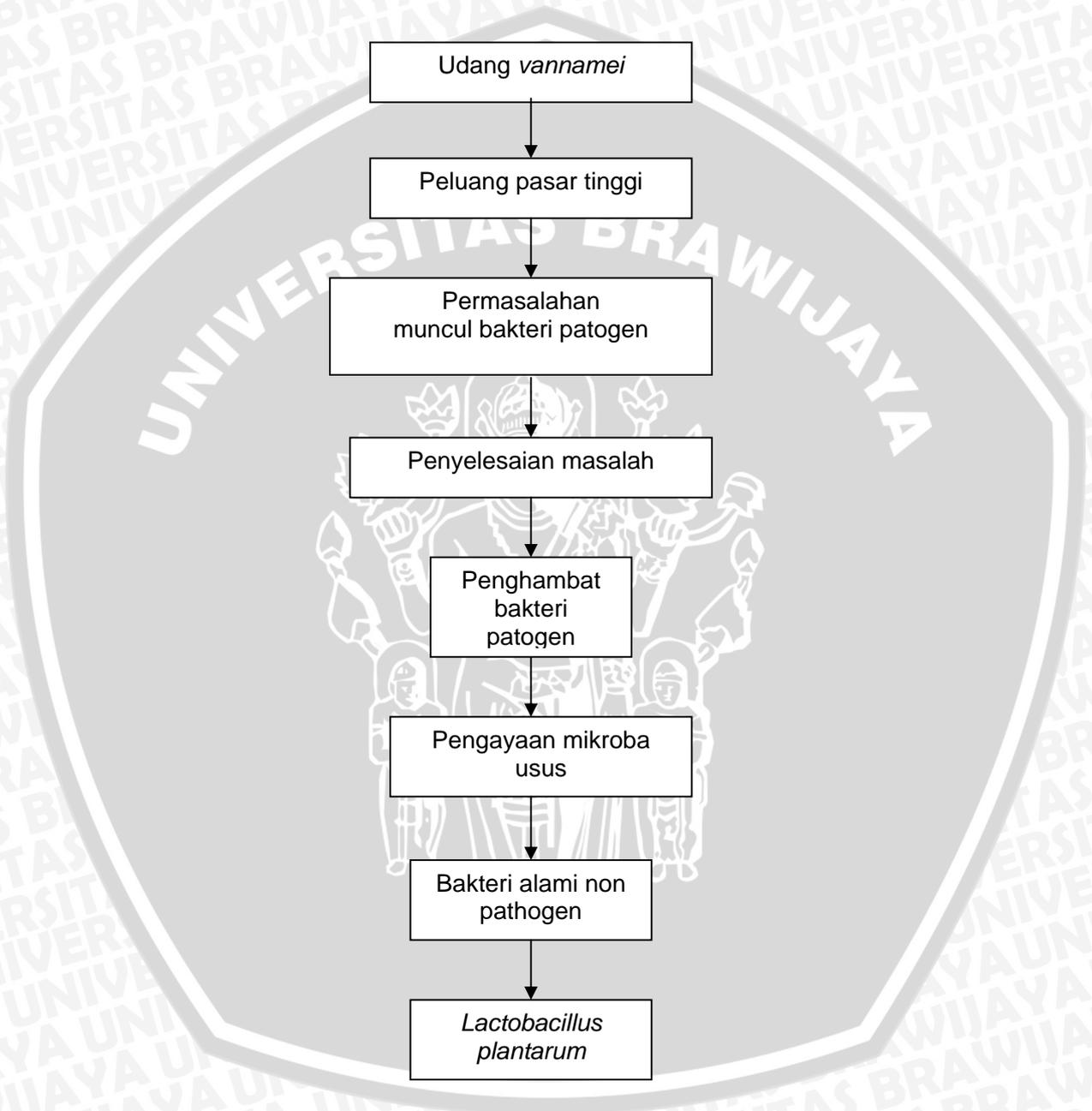
dan *Escherichia coli*, bahkan filtrat yang sudah disimpan selama 6 bulan memiliki kemampuan sama. *Lactobacillus* juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri lain yang merugikan atau patogen (Hardiningsih *et al*, 2006).

1.2 Rumusan Masalah

Vibrio merupakan bakteri yang berbahaya dalam kegiatan budidaya perikanan laut dan payau, baik bagi jenis ikan maupun crustacea. *Vibrio* merupakan penyebab utama penyakit udang menyala dan dapat berperan sebagai patogen primer ataupun patogen sekunder. Sebagai patogen primer, *Vibrio* masuk melalui kontak langsung dengan organisme; sedangkan sebagai patogen sekunder, *Vibrio* menginfeksi organisme yang telah terlebih dahulu terinfeksi penyakit, selain itu *Vibrio* dapat merusak lapisan kutikula yang mengandung khitin dikarenakan *Vibrio* memiliki chitinase, lipase dan protease. Tjahjadi *et al.* (1994) dalam Rahmat, (2009) menyatakan bahwa populasi bakteri *V. harveyi* di lingkungan pemeliharaan udang dapat ditekan dengan cara mengintroduksi bakteri tertentu yang diisolasi dari perairan laut di sekitar tambak atau pembenihan udang.

Bakteri asam laktat merupakan jenis bakteri yang mampu menghasilkan asam laktat, hidrogen peroksida, antimikroba dan hasil metabolisme lain yang memberikan pengaruh positif. Isolasi bakteri asam laktat dilakukan untuk menghasilkan antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Dengan mengetahui aktivitas antimikroba terhadap bakteri tertentu sangat penting peranannya dalam mencegah terkontaminasinya oleh bakteri, khususnya bakteri patogen yang berbahaya sehingga dapat menimbulkan penyakit pada hewan. Berdasarkan informasi tersebut dapat diambil suatu rumusan masalah yaitu apakah bakteri asam laktat dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* secara in-

in vitro? Adapun untuk memudahkan, maka perumusan masalah disajikan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Konsep Penelitian

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan bakteri asam laktat (*L. plantarum*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* secara in-vitro.

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi dalam pencegahan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *V. harveyi* dengan menggunakan bakteri asam laktat (*L. plantarum*).

1.5 Hipotesis

H0 : Diduga bahwa penggunaan bakteri asam laktat (*L. plantarum*) dengan pemanenan pada jam yang berbeda tidak berpengaruh terhadap diameter daerah hambatan bakteri *V. harveyi*.

H1 : Diduga bahwa penggunaan bakteri asam laktat (*L. plantarum*) dengan pemanenan pada jam yang berbeda berpengaruh terhadap diameter daerah hambatan bakteri *V. harveyi*.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, pada tanggal 12 Oktober 2009 sampai 16 November 2009.

2 TINJUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *Vibrio harveyi*

2.1.1 Klasifikasi

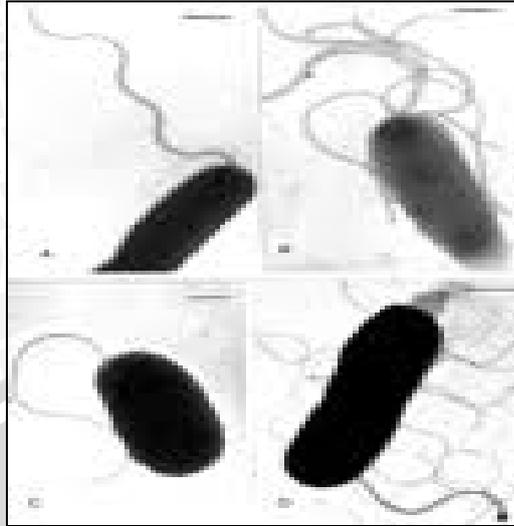
Menurut Anonymous (2009a), klasifikasi dari bakteri *Vibrio* spp. adalah sebagai berikut :

Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Ordo	: vibrionales
Famili	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Species	: <i>Vibrio harveyi</i> .

2.1.2 Karakteristik

Secara umum ciri-ciri *Vibrio* yaitu berbentuk koma atau batang pendek, bengkok atau lurus, bersel tunggal, mempunyai alat gerak berupa flagella kutub tunggal (*monotoric flagel*), termasuk gram negatif, ukuran sel 1-4 μm , tidak membentuk spora, oksidase positif, katalase positif, serta proses fermentasi karbohidratnya tidak membentuk gas. Bakteri ini selain didapatkan di air laut juga ditemukan di air payau, hal ini dibuktikan dengan ditemukannya penyakit vibriosis pada ikan air payau (Agung, 2007).

Menurut Fahri (2009), *Vibrio* adalah suatu jenis bakteri gram-negatif, mempunyai suatu tangkai yang bentuknya bengkok dan secara khas ditemukan pada air laut, *Vibrio* bersifat fakultatif anaerob positif test untuk oksidase dan tidak membentuk spora. Semua anggota jenis ini adalah motil (bergerak) dan mempunyai kutub flagella dengan sarung pelindung. Berdasarkan Anonymous (2010a), morfologi bakteri *Vibrio harveyi* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Bakteri *Vibrio harveyi*

2.1.3 Patogenesis Bakteri *Vibrio*

Penyakit yang disebabkan oleh vibrio juga merupakan masalah yang sangat serius dan umum menyebabkan penyakit pada ikan-ikan budidaya laut dan payau. Penularannya dapat melalui air atau kontak langsung dan menyebar sangat cepat pada pemeliharaan dengan kepadatan tinggi. Bakteri vibrio diketahui sebagai bakteri oportunistik dan merupakan bakteri yang sangat ganas dan berbahaya, karena dapat bertindak sebagai patogen primer dan sekunder. Sebagai patogen primer bakteri masuk tubuh ikan melalui kontak langsung, sedangkan sebagai patogen sekunder bakteri menginfeksi ikan yang telah terserang penyakit lain, misalnya oleh parasit (Johnny *et al*, 2002).

Tingkat patogenesis bakteri ditentukan oleh suatu mekanisme dalam proses pertumbuhan. Robertson *et al.* (1998) mengatakan bahwa bakteri *V. harveyi* bersifat patogen jika digunakan dalam perendaman selama 2 jam dengan dosis 10^5 sel/ml. Sifat patogenitas dari bakteri *V. harveyi* menurut Prajitno (2007) adalah :

- Serangan terjadi secara cepat dan menimbulkan kematian total.
- Udang yang terserang biasanya hancur sehingga bangkainya tidak kelihatan.
- Bakteri ini dapat memusnahkan larva dalam waktu 1-2 hari sejak serangan awal.
- Bakteri ini mudah menular (melalui pakan, air, peralatan maupun aktivitas manusia).
- Dapat menyerang sepanjang tahun tetapi cenderung terjadi saat perubahan iklim atau suhu yang mendadak.

Sejumlah bakteri dapat secara serempak menghasilkan cahaya. Peristiwa ini disebut *bioluminescens* apabila telah mencapai suatu *quorum*. Peristiwa ini dapat diamati saat terjadi penyakit kunang-kunang pada benur atau larva udang di sejumlah panti pemeliharaan benur (*shrimp hatchery*). Suatu spesies *Vibrio* (bisa *V. harveyi* atau *V. campbelli*) merupakan bakteri laut yang umum dijumpai pada air laut. Jumlah bakteri ini dapat berkembang (lebih dari 100 sel/mililiter air laut atau air payau) dan jika benurnya dalam kondisi tidak sehat, maka jumlah bakteri ini dapat meningkat dengan cepat di dalam tubuh benur sehingga tercapai *quorum*. Kumpulan *Vibrio* tersebut tidak hanya menyala tetapi juga mengeluarkan segala macam enzim ekstraselular yang akhirnya membunuh benurnya. Pada benur yang sehat secara normal dapat ditemukan *V. harveyi* tetapi jumlahnya di bawah *quorum*, sehingga tidak terjadi patogen pada benur. Apabila jumlahnya mencapai *quorum* bisa mengubah perilakunya menjadi patogen. Pada sejumlah bakteri gram negatif termasuk *Vibrio*, yang telah dipelajari ternyata kelompok bakteri ini menggunakan senyawa *Acyl Homoserine Lactone* (AHL) tertentu untuk sinyal komunikasi atau bahasanya.

AHL ini umumnya bersifat khusus untuk spesies bakteri tertentu. Sebagai contoh: *V. harveyi* menggunakan *N-(3-hydroxy)-butanoyl-L-homoserine lactone*

sebagai sinyalnya. Bila jumlah selnya telah mencapai kepadatan tertentu maka AHL itu akan membentuk kompleks dengan protein pengatur khusus yang akhirnya berfungsi untuk mengaktifkan ekspresi sejumlah enzim-enzim untuk menciptakan bioluminescence, enzim khitinase, dan protease ekstraseluler, serta faktor-faktor patogenesis lainnya (Suwanto, 2002).

2.1.4 Habitat

Bakteri *Vibrio sp.* adalah jenis bakteri yang dapat hidup pada salinitas yang relatif tinggi. Sebagian besar bakteri berpendar bersifat halofil yang tumbuh optimal pada air laut bersalinitas 20-40‰, tumbuh pada pH 4 - 9 dan tumbuh optimal pada pH 6,5 - 8,5 atau kondisi alkali dengan pH 9,0. Bakteri *Vibrio* merupakan genus yang dominan pada lingkungan air payau dan estuaria. Umumnya bakteri *Vibrio* menyebabkan penyakit pada hewan perairan laut dan payau (Rahmat, 2008a). Menurut Prajitno (2007), suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri *Vibrio spp.* berkisar antara 30-35 °C. Sedangkan pada suhu 4 °C dan 45 °C bakteri tersebut tidak dapat tumbuh dan pada suhu 55 °C akan mati.

2.1.5 Infeksi dan Tanda-Tanda Serangan

Penyakit kunang-kunang ditandai dengan adanya larva maupun juvenil yang menyala seperti kunang-kunang pada saat malam hari. Penyakit ini diduga disebabkan oleh bakteri *V. Harveyi* pada udang fase larva dan juvenil selama air mediana payau. Penyakit biasanya muncul akibat tercemarnya air laut yang digunakan selama pembenihan oleh bakteri tersebut. Penyakit ini biasanya muncul ketika kondisi kualitas air yang jelek dan akibatnya tidak menimbulkan kematian secara masal (Anonymous, 2009b). Menurut Martutik (2005) *V. harveyi* dan *V. alginolyticus* merupakan bakteri penyebab penyakit pada udang yang

mampu menginfeksi bagian-bagian tubuh udang baik di luar maupun di dalam tubuh.

Udang yang terserang di bagian luar oleh bakteri tersebut pada umumnya kulit menjadi keropos atau lunak. Ciri-ciri udang yang terserang vibriosis antara lain kondisi tubuh lemah, berenang lambat, nafsu makan hilang, badan mempunyai bercak merah-merah (*red discoloration*) pada pleopod dan abdominal serta pada malam hari terlihat menyala (Sunaryoto et al., 1987 dalam Rahmat, 2008b). Udang yang terkena vibriosis akan menunjukkan gejala nekrosis. Bagian kaki renang (pleopoda) dan kaki jalan (pereopoda) menunjukkan melanisasi. Bagian mulut yang kehitaman adalah kolonisasi bakteri pada esophagus dan mulut.

2.2 *Lactobacillus plantarum*

2.2.1 Klasifikasi

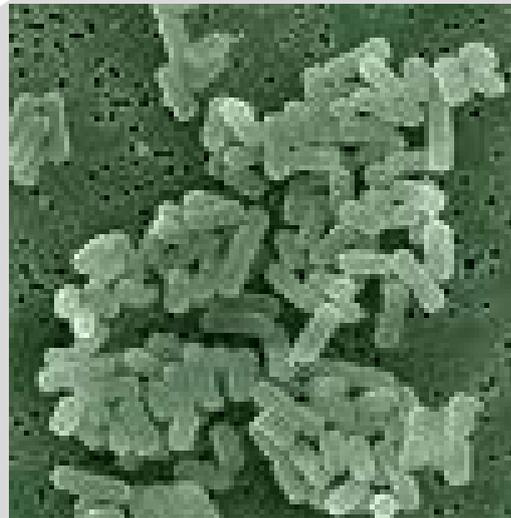
Menurut Anonymous (2009c), klasifikasi dari bakteri *Lactobacillus plantarum* adalah sebagai berikut :

Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Ordoer	: Lactobacillales
Famili	: Lactobacillaceae
Genus	: <i>Lactobacillus</i>
Species	: <i>Lactobacillus plantarum</i>

2.2.2 Karakteristik

L. plantarum merupakan salah satu jenis BAL *homofermentatif* dengan temperatur optimal lebih rendah dari 37°C. *L. plantarum* berbentuk batang (0,5-1,5 s/d 1,0-10 m) dan tidak bergerak (*nonmotil*). Bakteri ini memiliki sifat katalase

negatif, aerob atau fakultatif anaerob, cepat mencerna protein, tidak mereduksi nitrat, toleran terhadap asam, dan mampu memproduksi asam laktat. Dalam media agar, *L. plantarum* membentuk koloni berukuran 2-3 mm, konveks, dan dikenal sebagai bakteri pembentuk asam laktat (Rostini, 2007). pH optimum untuk pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* adalah 6,8 dan fase kematian sel atau umur kultur dari *Lactobacillus plantarum* adalah 32 jam (Sutoyo, 1998). Berdasarkan Anonymous (2010b), morfologi bakteri *Lactobacillus plantarum* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Bakteri *Lactobacillus plantarum*

2.2.3 Habitat

Bakteri laktat (*Lactobacillus*) merupakan kelompok mikroba dengan habitat dan lingkungan hidup sangat luas, baik di perairan (air tawar ataupun laut), tanah, lumpur, maupun batuan. Bakteri ini juga menempel pada jasad hidup lain seperti tanaman, hewan, serta manusia (Sumantri, 2004). Menurut Anonymous (2009d) *Lactobacillus* merupakan bakteri yang habitatnya berasal dari membran mukosa hewan atau manusia, tanaman, serta makanan hasil fermentasi.

2.2.4 Kandungan Kimia

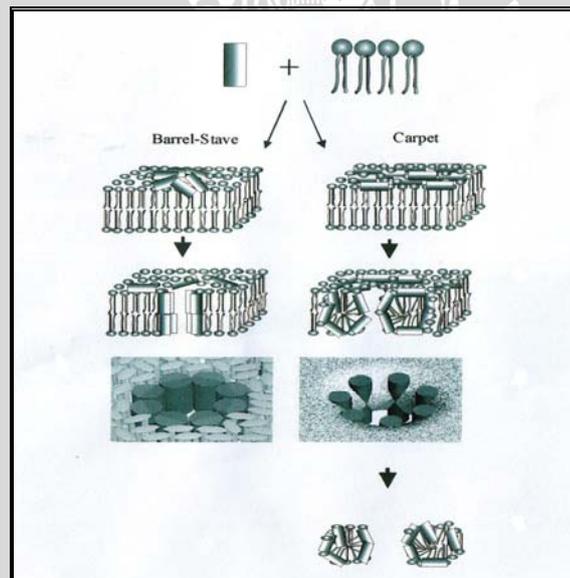
Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dapat menghambat kontaminasi dari mikroorganisme patogen dan penghasil racun karena kemampuannya untuk menghasilkan asam laktat dan menurunkan pH substrat, selain itu BAL dapat menghasilkan hidrogen peroksida yang dapat berfungsi sebagai antibakteri. *L. plantarum* juga mempunyai kemampuan untuk menghasilkan bakteriosin yang berfungsi sebagai zat antibiotik (Jenie dan Rini, 1995 dalam Rostini 2007). Menurut Anonymous (2008), *Lactobacillus* juga dapat menghasilkan H_2O_2 akibat adanya oksigen dan berfungsi sebagai antibakteri yang dapat menyebabkan adanya daya hambat terhadap pertumbuhan mikroorganisme lain. *Lactobacillus* mempunyai kemampuan untuk menghasilkan antibiotik yang disebut bakteriosin.

Bakteriosin diproduksi oleh bakteri asam laktat (BAL), didefinisikan sebagai protein yang aktif secara biologi atau kompleks protein (agregat protein, protein lipokarbohidrat, glikoprotein) yang disintesa secara ribosomal, dan menunjukkan aktivitas antibakteri. Bakteriosin efektif sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen dan pembusuk dan penyebab penyakit. Bakteriosin dari BAL lebih bersifat bakterisidal dibandingkan dengan bakteriolisis ataupun bakteriostatik pada sel-sel yang sensitif. Beberapa diantaranya lebih dominan bersifat bakteriostatik. Bakteriosin disintesis selama fase eksponensial pertumbuhan sel mengikuti pola klasik sintesis protein (Usmiati, 2009).

2.2.5 Mekanisme Kerja Antimikroba

Target kerja bakteriosin dari bakteri asam laktat adalah membran sitoplasma sel bakteri yang sensitif. Mekanisme aktivitas bakterisidal bakteriosin adalah sebagai berikut: (1) molekul bakteriosin kontak langsung dengan membran sel, (2) proses kontak ini mampu mengganggu potensial membran berupa destabilitas membran sitoplasma sehingga sel menjadi tidak kuat, dan (3)

ketidak stabilan membran mampu memberikan dampak pembentukan lubang atau pori pada membran sel melalui proses gangguan terhadap PMF (*Proton Motive Force*) (Gonzalez *et al.*, 1996 *dalam* Usmiati, 2009). Menurut Zhao (2003), Proses pembentukan pori pada membran sel terjadi melalui 2 mekanisme, yaitu model tong kayu (*barrel-stave model*) dan karpet (*carpet*) seperti pada Gambar 4. Pada model tong, peptida menghadap hampir tegak lurus terhadap membran, kemudian masuk dan membuat saluran ion sepanjang membran. Pada model karpet, peptida berikatan dengan permukaan membran. Jika konsentrasi ambang batas peptida tercapai, membran ditembus dan pori sementara dibentuk.



Gambar 4. Model Pembentukan Pori pada Membran.

Pengaruh pembentukan lubang sitoplasma merupakan dampak adanya bakteriosin yang menyebabkan terjadinya perubahan gradien potensial membran dan pelepasan mekul intraseluler maupun masuknya substansi ekstraseluler (lingkungan). Efeknya menyebabkan pertumbuhan sel terhambat dan

menghasilkan proses kematian pada sel yang sensitif terhadap bakteriosin. Menurut Gobel (2008), antimikroba adalah senyawa yang dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme hidup. Senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri disebut bakterostatik dan yang dapat membunuh bakteri disebut bakterisida.

2.3 Uji Efektivitas Antimikroba In vitro

2.3.1 Cara Cakram

Prosedur difusi-kertas cakram-agar yang distandarisasikan (metode Kirby-Bauer) merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibiotik untuk bakteri. Sensitivitas suatu bakteri terhadap antibiotik ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Semakin besar diameternya maka semakin terhambat pertumbuhannya (Pradhika, 2009).

Metode kertas cakram kelebihanannya yaitu, kemampuan bakteri probiotik untuk menghambat bakteri patogen dapat ditentukan dari zona bening yang dihasilkan. Namun memiliki kelemahan yaitu, tidak dapat menghitung jumlah bakteri yang ada. Terbentuknya zona bening pada kertas cakram mengindikasikan bahwa terdapat pertumbuhan bakteri probiotik dan penekanan pertumbuhan bakteri patogen. Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu, gangguan pada senyawa penyusun dinding sel, peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, menginaktivasi enzim, dan destruksi atau kerusakan fungsi material genetik (Widagdo, 2009).

3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan yang digunakan dalam Penelitian

- Biakan murni bakteri asam laktat (*Lactobacillus plantarum*)
- Biakan murni *Vibrio harveyi*
- TCBSA (*Thiosulfate Cytrat Bilesalt Suckrose Agar*) Merek OXOID, dosis penggunaan 44 gr/l
- NB (*Nutrient Broth*) merek OXOID, dosis penggunaan 6,5 gr/l
- Aquades
- Alkohol 70%
- Spirtus
- Tali
- Kertas alumunium foil
- Kertas label
- Kapas
- Tissue
- Kain lap

3.1.2 Alat yang digunakan dalam Penelitian

- Autoklaf
- Lemari pendingin
- Inkubator
- Timbangan analitik
- Hotplate
- Vortex



- Cawan petri
- Beaker glass
- Tabung reaksi
- Erlenmeyer
- Gelas ukur
- Pipet volume
- Pipet tetes
- Bola hisap
- Bunsen
- Jarum ose
- Triangle
- Spatula
- Pinset
- Sprayer
- Jangka Sorong
- Rak tabung reaksi
- Gunting
- Botol film



3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

3.2.1 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Menurut Nazir (2005), penelitian eksperimental adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap obyek penelitian serta adanya kontrol. Tujuan penelitian eksperimental adalah untuk menyelidiki kemungkinan saling hubungan sebab-akibat dengan cara mengenakan kepada satu atau lebih kelompok eksperimental satu atau lebih kondisi perlakuan dan membandingkan

hasilnya dengan satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak dikenai kondisi perlakuan (Suryabrata, 2006)

3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana setiap perlakuan dilakukan sebagai satuan tersendiri, tidak ada hubungan pengelompokan. Rumus dari model RAL (Yitnosumarto, 1991) adalah sebagai berikut :

$$Y = \mu + T + \varepsilon$$

Keterangan:

- Y : Nilai pengamatan
 μ : Nilai rata-rata harapan
T : Pengaruh perlakuan
 ε : Galat

Penelitian terdiri dari 7 perlakuan dengan 3 kali ulangan dan 1 kontrol. Sebagai perlakuan adalah pemberian biakan bakteri asam laktat (*Lactobacillus plantarum*) dengan pemanenan pada jam yang berbeda (jam ke-0, ke-4, ke-8, ke-12, ke-16, ke-20, dan ke-24), adapun penentuan pemanenan pada jam-jam tersebut berdasarkan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan peneliti sebelumnya oleh Guntoro (2009), yaitu uji daya hambat beberapa kandidat bakteri probiotik (*Bacillus megaterium*, *Bacillus firmus*, *Actinobacillus*, *Pseudomonas stutzeri*) terhadap *V. harveyi* dengan pemanenan bakteri dilakukan tiap 4 jam. Adapun perlakuan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

A = Pemberian bakteri asam laktat (*L. plantarum*) yang dipanen pada jam ke-0

B = Pemberian bakteri asam laktat (*L. plantarum*) yang dipanen pada jam ke-4

C = Pemberian bakteri asam laktat (*L. plantarum*) yang dipanen pada jam ke-8

D = Pemberian bakteri asam laktat (*L. plantarum*) yang dipanen pada jam ke-12

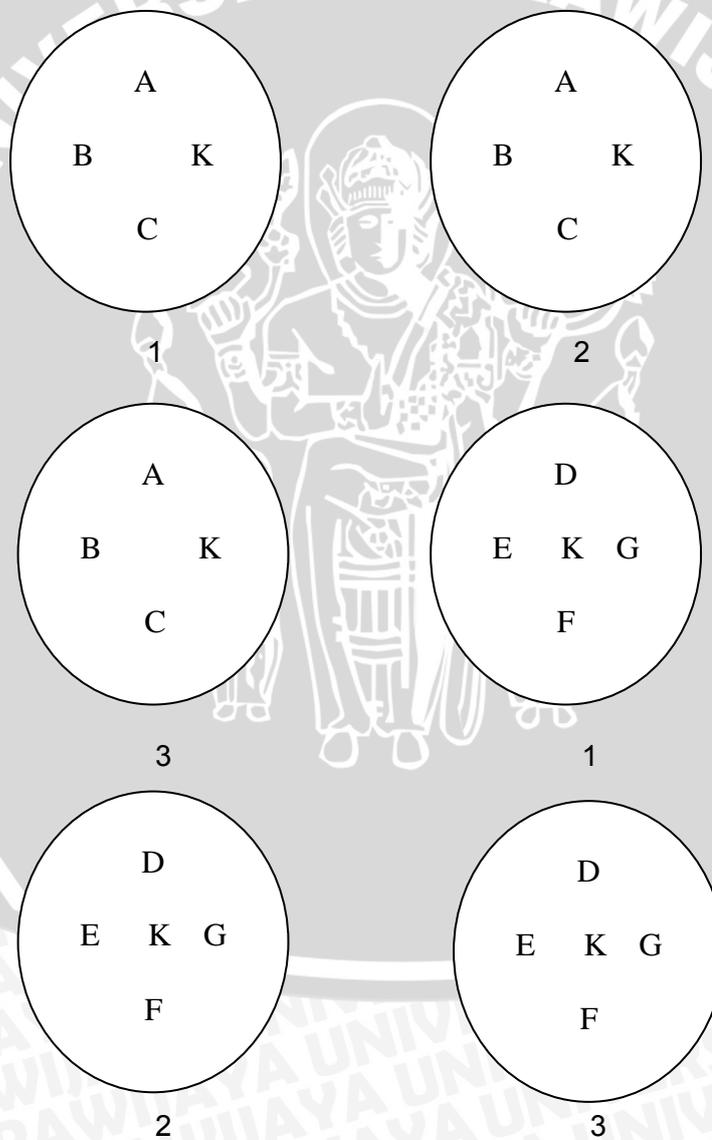
E = Pemberian bakteri asam laktat (*L. plantarum*) yang dipanen pada jam ke-16

F = Pemberian bakteri asam laktat (*L. plantarum*) yang dipanen pada jam ke-20

G = Pemberian bakteri asam laktat (*L. plantarum*) yang dipanen pada jam ke-24

K = Kontrol (tanpa perlakuan)

Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali, sehingga jumlah keseluruhan pengamatan sebanyak 21 unit eksperimen seperti pada Gambar 5 berikut ini:



Gambar 5. Denah Penelitian

Keterangan:

A, B, C, D, E, F, G :Perlakuan

1, 2, 3 :Ulangan

K :Kontrol

3.3 Prosedur penelitian

3.3.1 Persiapan Penelitian

a. Sterilisasi alat dan bahan

- Dicuci alat-alat yang akan digunakan, dikeringkan kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas perkamen dan diikat menggunakan benang.
- Air secukupnya dituang ke dalam autoclave, kemudian alat yang telah dibungkus kertas perkamen dimasukkan ke dalam autoclave dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara simetris.
- Kompor pemanas dinyalakan, setelah mencapai suhu 121°C dan manometer menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15-20 menit dengan cara membuka dan atau menutup kran uap yang berada di bagian atas tutup autoclave.
- Kompor dimatikan. Tunggu beberapa saat sampai termometer dan manometer menunjukkan angka 0 (nol), kemudian buka kran uap lalu buka penutup autoclave dengan cara simetris.
- Alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil.
- Alat yang telah disterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

b. Pembuatan Media TCBSA (*Thiosulfate Citrat Bilesalt Sukrose Agar*)

- TCBSA sejumlah 4,4 gram, KCl 0,375 gram, MgSO_4 0,347 gram, NaCl 0,67 gram dilarutkan dalam 50 ml air aquadest steril dalam erlenmeyer steril.

- Dipanaskan di atas hotplate hingga mendidih dan homogen kemudian dituang dalam cawan petri steril dalam keadaan panas
- Media dibiarkan memadat

Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin.

Cawan petri diletakkan terbalik yaitu bagian tutup berada di bawah untuk menghindari tetesan air kondensasi dalam tutup.). Komposisi media TCBSA dapat dilihat pada Tabel 1 sebagai berikut :

Tabel 1. Komposisi TCBSA

Unsur-unsur	Jumlah (g/l)
Yeast extract powder	5,0
Bacteriological peptone	10,0
Sodium thiosulphate	10,0
Sodium citrate	10,0
Oxbile	8,0
Sucrose	20,0
Sodium chloride	10,0
Ferric citrate	10,0
Bromothymol blue	0,04
Thymol blue	0,04
Agar	14

(Sumber : OXOID LTD)

c. Pembuatan Media NB (*Nutrient Broth*)

- NB sejumlah 0,65 gram, KCl 0,375 gram, MgSO₄ 0,347 gram, NaCl 0,67 gram dilarutkan dalam 50 ml air aquadest steril dalam erlenmeyer steril.
- Dipanaskan di atas hotplate hingga mendidih dan homogen
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

- Media yang akan dipakai dibiarkan dingin hingga mencapai suhu $\pm 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas. Komposisi media NB dapat dilihat pada Tabel 2 sebagai berikut:

Tabel 2. Komposisi NB

Unsur-unsur	Jumlah (g/l)
Lab lemco powder	1,0
Yeast extract	2,0
Peptone	5,0
Sodium chloride	5,0

(Sumber : OXOID LTD)

d. Pembuatan Media Padat

Pembuatan media padat bertujuan meremajakan bakteri *V. harveyi* untuk menghindari kematian akibat kompetisi nutrisi.

- Disiapkan petridisk yang berisi media TCBSA
- Diambil biakan murni *V. harveyi* sebanyak 1 ose
- Digoreskan ke dalam media TCBSA secara zig-zag.
- Media TCBSA diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.

e. Pembuatan Media Cair

Pembuatan media cair bertujuan untuk mengkultur bakteri *V. harveyi* yang akan digunakan dalam uji antimikroba dengan menggunakan metode cakram.

- Disiapkan 4 ml media NB dalam tabung reaksi yang telah disterilkan dengan autoclave.
- Diambil 5 ose *V. harveyi* dari biakan murni dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 4 ml media NB tersebut

- Media yang telah mengandung *V. harveyi* ditutup dengan kapas steril dan aluminium foil dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 18-24 jam.
- Hasil biakan disimpan dalam lemari pendingin.

f. Identifikasi Bakteri

Isolasi bakteri *Lactobacillus plantarum* dari udang *Vannamei*

1. Sampel udang di ambil bagian organ dalamnya, dikumpulkan sampai kurang lebih 1 gram sampel.
2. Sampel digerus dengan dengan ditambahkan NaCl fisiologis 0,9% untuk memudahkan penggerusan, kemudian sampel ditimbang.
3. Sampel dimasukkan kedalam larutan pengencer (NaCl +Pepton 0,1%) dengan pebandingan 1 gram sampel dalam 9 ml pengencer.
4. Divortex samapai homogen, kemudian dibuat seri pengenceran P-1 s/d P-3.
5. Masing–masing dari seri pengenceran tersebut dikultur dalam media MRSA (*Man Rogosa Sharpe Agar*) dengan metode *pour plate agar*.
6. Kemudian MRSA yang sudah mengandung sampel tersebut diinkubasikan diinkubator suhu 30°C selama 2x 24 jam. Setelah menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri, dilakukan pengamatan morfologi koloni meliputi : Bentuk, ukuran, warna, elevasi, konsistensi, koloni dan lain sebagainya.

- **Prosedur Mikroskopis**

Sebelum pengamatan mikroskopis dilakukan pewarnaan gram, prosedurnya sebagai berikut:

1. Dibuat preparat diatas kaca obyek, dikeringkan pada suhu kamar, jika sudah kering difiksasi dengan cara dipanaskan diatas nyala api 3-4 kali lalu dibiarkan dingin.
2. Setelah dingin diberi larutan kristal violet diatas Preparat, didiamkan selama 1 menit.
3. Preparat dibilas dengan air, kemudian dituangi larutan Lugol diamkan 1 menit dan bilas dengan air.
4. Preparat dibilas dengan Alkohol 96% hingga warna violet memudar dan bilas dengan air.
5. Preparat diberi larutan safranin diamkan 30 detik, dibilas dengan air, dan dikeringkan.
6. Setelah kering dilakukan pengamatan dibawah mikroskop perbesaran 100x dan menggunakan minyak imersi.

- **Prosedur Uji Fermentasi Gula-gula (Biokimia)**

1. Diambil 5 koloni dimasukkan dalam 5 ml NaCl Fisiologis 0,9%
2. Divortex sampai homogen, kemudian dengan mikropipet suspensi bakteri tersebut diambil 50 μ l dan dimasukkan kedalam sumuran-sumuran microbact 12B yang sudah mengandung jenis gula-gula yang diujikan
3. Microbact 12B yang sudah diisikan suspensi sampel bakteri diinkubasikan 30°C selama 12-18 jam
4. Dilakukan pengamatan terhadap masing-masing sumuran
5. Hasil fermentasi gula dikatakan positif jika terbentuk warna kuning pada masing-masing sumuran , dan negative jika warna tetap biru.

- Prsedur Uji Katalase
 1. Diambil satu ose koloni dari kultur dan diletakkan pada permukaan obyek glas
 2. Ditetesi dengan larutan H_2O_2 3%. Uji positif jika terbentuk buih gelembung udara , dan negative jika tidak timbul buih. Hasil uji katalase menunjukkan : Tidak timbul buih (Negatif).
- Prosedur Uji Pertumbuhan NaCl
 1. Sampel bakteri dari koloni primer dikultur kedalam media Tripton Soya Broth NaCl : 3%, 4%, 6,5%, dan 10 %.
 2. Diinkubasi pada suhu $30^{\circ}C$ selama 24 jam. Hasil positif jika ada pertumbuhan atau keruh dalam media, dan negative jika tidak ada pertumbuhan atau jernih dalam media.

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Prosedur Uji Antimikroba

Cara kerja pengujian antimikroba :

- 5 inokulum biakan murni bakteri *V. harveyi* ditanam dalam 4 ml media cair (Nutrient Broth) dan diinkubasi pada suhu $35^{\circ}C$ selama 3 jam sehingga terbentuk kekeruhan yang sama dengan larutan Standart *Mc Farland* (10^8 sel/ml). Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga dicapai kepadatan bakteri menjadi 10^6 sel/ml
- Diambil 0,05 ml bakteri (10^6 sel/ml) dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi media agar dengan ketebalan ± 6 mm.
- Diratakan bakteri dengan triangle dan dibiarkan selama 5 menit
- Kertas cakram dicelupkan dalam larutan *L. plantarum*.
- Diangkat, biarkan sejenak agar tiris, selanjutnya diletakkan kertas cakram pada permukaan agar.

- Kertas cakram ditekan menggunakan pinset supaya menempel sempurna di permukaan agar.
- Diinkubasi pada suhu 35 °C selama 24-48 jam. Setelah diinkubasi, diukur diameter zona hambat (mm).

3.4 Parameter Uji

3.4.1 Parameter Utama

Parameter utama menggunakan parameter kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari hasil pengukuran daerah hambatan *L. plantarum* terhadap pertumbuhan bakteri *V. harveyi* pada setiap perlakuan yang terlihat disekitar kertas cakram.

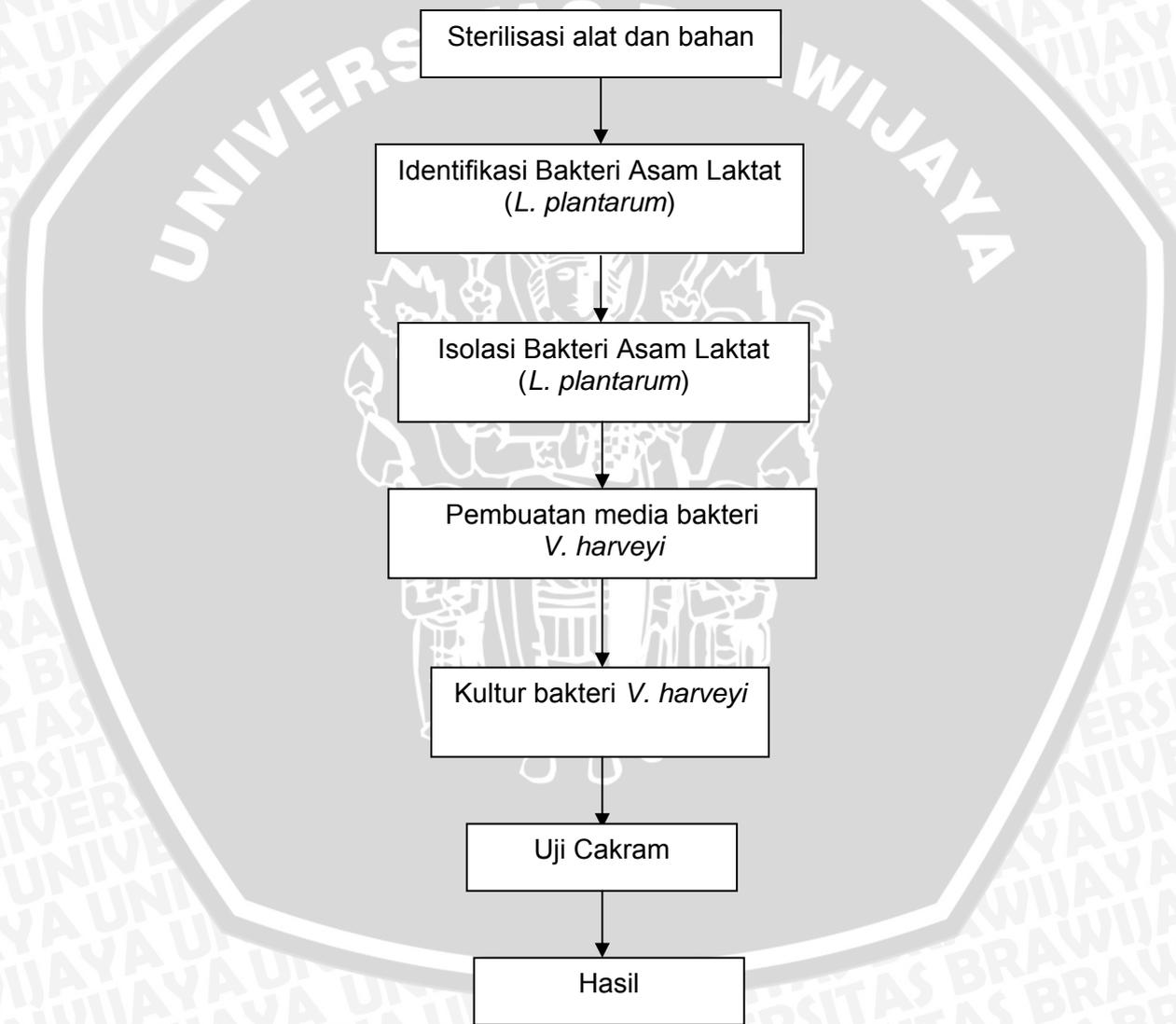
3.4.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang pada penelitian ini adalah suhu inkubator dan pH media, yang keduanya merupakan faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Anonymous (2003) menjelaskan suhu terendah dimana bakteri dapat tumbuh disebut *minimum growth temperature*. Sedangkan, suhu tertinggi dimana bakteri dapat tumbuh dengan baik disebut *maximum growth temperature*. Suhu dimana bakteri dapat tumbuh dengan sempurna di antara kedua suhu tersebut disebut suhu optimum. Untuk pertumbuhannya, bakteri juga memerlukan pH tertentu, namun pada umumnya bakteri memiliki jarak pH yang sempit sekitar pH 6,5-7,5 atau pada pH netral.

3.5 Analisa Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan, berupa pemberian *L. plantarum* terhadap respon parameter yang diukur, berupa luas daerah hambatan, maka dilakukan analisis keragaman atau uji F dan apabila berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji BNT untuk menentukan perlakuan mana yang

memberikan respon terbaik pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%). Sedangkan Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan hasil yang dipengaruhi, dilakukan perhitungan analisis regresi yang tujuannya untuk mengetahui sifat dan fungsi regresi yang memberikan keterangan tentang pengaruh perlakuan yang terbaik pada respon. Adapun untuk memudahkan, maka prosedur penelitian dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Bagan Prosedur Penelitian

4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (*Lactobacillus plantarum*)

Hasil identifikasi bakteri dari usus udang Vannamei menghasilkan bakteri *Lactobacillus plantarum*. Bakteri yang terdapat dalam usus udang diisolasi dan diidentifikasi terlebih dahulu berdasarkan sifat koloni (bentuk, ukuran, warna, elevasi, konsistensi, koloni) dengan pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi kemudian dilanjutkan dengan uji fermentasi gula-gula (biokimia). Menurut Dedy (2008), uji gula-gula ini dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang mampu memfermentasikan karbohidrat. Pada uji gula-gula hanya terjadi perubahan warna pada media glukosa yang berubah menjadi warna kuning, artinya bakteri ini membentuk asam dari fermentasi glukosa. Setelah uji gula-gula, dilanjutkan dengan uji katalase. Menurut Partic (2008), uji katalase digunakan untuk mengetahui aktivitas katalase pada bakteri yang diuji. Kebanyakan bakteri memproduksi enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Enzim katalase diduga penting untuk pertumbuhan aerobik karena H_2O_2 yang dibentuk dengan pertolongan berbagai enzim pernafasan bersifat racun terhadap sel mikroba. Bakteri katalase negatif tidak menghasilkan gelembung-gelembung. Hal ini berarti H_2O_2 yang diberikan tidak dipecah oleh bakteri katalase negatif, sehingga tidak menghasilkan oksigen. Bakteri katalase negatif tidak memiliki enzim katalase yang menguraikan H_2O_2 . Beberapa bakteri yang termasuk katalase negatif adalah *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, dan *Clostridium*. Uji terakhir yang dilakukan adalah uji pertumbuhan NaCl, dengan kadar NaCl 3%, 4%, 6,5%, 10%. Digunakan kadar NaCl yang berbeda adalah untuk mengetahui ketahanan tumbuh bakteri. Menurut Madigan (1997) dalam Rahayu, et al (2002), ketahanan tumbuh bakteri pada media berkadar garam diklasifikasikan dalam 4 kategori yaitu:

non-halophiles (< 1% NaCl), *mild-halophiles* (1-6%), *moderate-halophiles* (6-15%) dan *extrimly halophiles* (15 - 30%). Adapun hasil uji-uji pada proses isolasi dan identifikasi dapat dilihat pada Lampiran 1.

4.2 Kultur Murni Bakteri *Vibrio harveyi*

Isolat bakteri *V. harveyi* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Bakteri tersebut kemudian diremajakan, untuk menghindari terjadinya kematian bakteri akibat kompetisi nutrisi, dengan cara dipindah dan ditanam pada media yang baru secara aseptis. Hal ini dilakukan agar tidak terjadi kontaminasi. Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri *V. harveyi* selama penelitian berupa media padat, yaitu TCBSA (*Thiosulfate Citrat Bilesalt Sukrose Agar*) dan media cair yaitu NB (*Nutrient Borth*). TCBS (*Thiosulfate Citrat Bilesalt Sukrose*) Agar merupakan media selektif, yaitu media yang ditambahkan zat tertentu sehingga bersifat selektif untuk merangsang pertumbuhan satu jenis mikroba dan jenis yang lain mati, contoh : bakteri *Vibrio sp* yang hanya dapat tumbuh (Krettiawan, 2009).

Penanaman bakteri pada media padat (TCBSA) dilakukan dengan metode gores dan diinkubasi selama 18-24 jam. Menurut Pelezar dan Chan (1986), setelah inkubasi, sel-sel mikroba individu itu memperbanyak diri sedemikian cepatnya sehingga di dalam waktu 18 sampai 24 jam terbentuklah massa sel yang dapat dilihat dan dinamakan koloni. Koloni ini tampak oleh mata visual, hasil pengamatan selama penelitian menunjukkan bahwa bakteri *V. harveyi* yang tumbuh pada media padat TCBSA secara visual membentuk koloni berwarna kuning. Hal ini berkaitan dengan kemampuan *V. harveyi* untuk memanfaatkan sukrosa. Sebagaimana dijelaskan dalam Anonymous (2009e), bahwa sebagian vibrio yang memfermentasi sukrosa (koloni berwarna kuning) berbeda dengan

spesies yang tidak memfermentasi sukrosa (koloji berwarna biru-hijau). Hasil biakan *V. harveyi* di media padat (TCBSA) dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil Biakan Murni Bakteri *Vibrio harveyi* pada Media Padat TCBSA

Sedangkan pembiakan bakteri dalam media cair (NB), penentuan kepadatan bakteri dilakukan dengan cara membandingkan hasil biakan dengan larutan standar McFarland. Metode ini dilakukan dengan menyetarakan kekeruhan hasil inokulasi dengan kekeruhan standar larutan McFarland secara visual. Menurut Anonymous (2009f), larutan McFarland dibuat dengan mencampurkan larutan asam belerang (H_2SO_4) 1% dan larutan Barium Chloride ($BaCl_2$) 1% sehingga diperoleh suspensi Barium Sulfat kira-kira sama dengan sejumlah suspensi bakteri. Pada penelitian ini kepadatan hasil inokulasi pada media NB sebesar 10^8 sel/ml yang kemudian dilakukan pengenceran sehingga diperoleh kepadatan bakteri untuk uji cakram sebesar 10^6 sel/ml. Menurut Prajitno (2007), *Vibrio* spp. memerlukan konsentrasi 10^5 sel/ml agar terjadi infeksi yang mematikan pada larva udang. Pernyataan ini sejalan dengan hasil penelitian Robertson (1998) bahwa *V. harveyi* bersifat patogen terhadap larva udang (*P. vannamei*) pada infeksi 10^5 sel/ml selama 2 jam.

4.3 Uji Cakram

Uji cakram dilakukan dengan menggunakan beberapa kertas cakram yang masing-masing dicelupkan ke dalam *L. plantarum* kemudian diletakkan pada kultur murni dari bakteri *V. harveyi* di media agar. Kemudian diinkubasi selama 24 jam dan diamati. Disekililing sekitar kertas cakram akan tampak daerah bakteri yang tidak tumbuh. Hasil uji daya antibakteri menggunakan *L. Plantarum* dengan metode cakram menunjukkan bahwa *L. plantarum* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Hal ini ditandai dengan terbentuknya daerah bening di sekitar kertas cakram. Sesuai dengan pernyataan Ersam dan Chumaidah (2006), daerah terang yang terbentuk menggambarkan adanya aktivitas bakteri yang telah dihambat. Semakin besar diameter zona terang yang terbentuk, semakin aktif zat uji tersebut sebagai antimikrobia. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak bakteri yang dihambat pertumbuhannya oleh zat uji tersebut. Selanjutnya dilakukan pengamatan setelah masa inkubasi 48 jam untuk menentukan sifat *L. plantarum* terhadap bakteri *V. harveyi*, apakah bersifat bakteristatik (menghambat) atau bakteriosidal (membunuh).

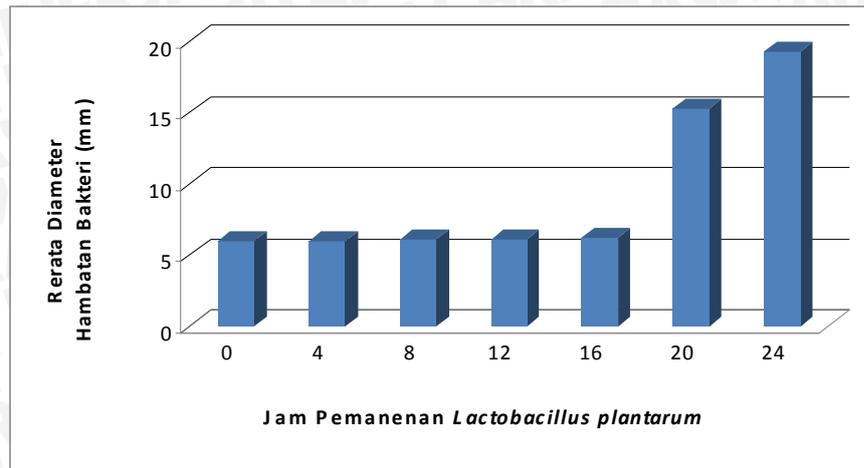
Pemeriksaan daya antimikrobia setelah masa inkubasi 48 jam, menunjukkan bahwa *L. plantarum* dengan waktu pemanenan pada jam ke-0, ke-4, ke-8, ke-12, ke-16, ke-20 dan jam ke-24 bersifat bakteristatik yaitu hanya menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Gambar hasil uji cakram *L. plantarum* terhadap bakteri *V. harveyi* dapat dilihat pada Lampiran 3. Berdasarkan hasil yang diperoleh, diameter daerah hambat (daerah yang tidak ditumbuhi bakteri) yang terbentuk bervariasi pada masing-masing perlakuan. Daerah hambat hasil uji cakram yang terbentuk pada masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Diameter Daerah Hambatan pada Masing-Masing Perlakuan

Perlakuan (Jam ke)	Diameter Daerah Hambatan (mm)			Total	Rerata
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
0	6,00	6,01	6,01	18,02	6,01
4	6,03	6,05	6,02	18,10	6,03
8	6,11	6,08	6,08	18,27	6,09
12	6,15	6,12	6,14	18,41	6,14
16	6,21	6,20	6,23	18,64	6,21
20	15,28	15,27	15,30	45,85	15,28
24	19,23	19,38	19,23	57,84	19,28

Berdasarkan Tabel 3, daerah hambatan terkecil diperoleh pada pemanenan *L. Plantarum* jam ke-0 yaitu 6,01 mm sedangkan pemanenan *L. plantarum* pada jam ke-24 memberikan daerah hambat terbesar, yaitu 19,28 mm.

Untuk lebih memperjelas peningkatan diameter daerah hambat dengan pemanenan *L. plantarum* pada jam yang berbeda dapat digambarkan dalam diagram batang hubungan antara pemanenan *L. plantarum* pada jam yang berbeda dengan daerah hambat yang ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Diagram Batang Hubungan antara Pemanenan *Lactobacillus plantarum* pada Jam yang Berbeda dengan Diameter Daerah Hambat Rata-Rata (mm)

Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa semakin lama jam pemanenan *L. plantarum*, maka daerah hambat yang terbentuk semakin lebar. Hal ini disebabkan semakin lama jam pemanenan bakteri maka akan diperoleh bakteriosin yang berasal dari metabolit sekunder bakteri tersebut. Menurut Santoso (2009), bakteriosin yang merupakan metabolit sekunder dari BAL yang disintesa pada pertengahan fase logaritma sampai fase stasioner mempunyai sifat bakterisidal. Metabolit sekunder adalah senyawa yang disintesa oleh suatu organisme, tidak untuk memenuhi kebutuhan primernya seperti tumbuh dan berkembang melainkan untuk mempertahankan eksistensinya dalam berinteraksi dengan lingkungannya (Malik dan Kusmiati, 2002). Sedangkan menurut Wibowo (2009), metabolit sekunder adalah hasil metabolit yang tidak digunakan untuk proses pertumbuhan, tetapi misalnya untuk pertahanan diri, contoh protein, asam lemak, karbohidrat, senyawa antimikroba dan lain-lain. Menurut Demain (1998), ada beberapa kondisi yang mempengaruhi metabolit sekunder yaitu: keterbatasan nutrisi yang tersedia di lingkungan tumbuh suatu bakteri, penambahan senyawa penginduksi dan penurunan kecepatan tumbuh. Barry dan

Wainwright (1997) menambahkan, umumnya metabolit sekunder tidak terbentuk jika lingkungan tumbuh mengandung cukup nutrisi untuk pertumbuhan bakteri karena senyawa tersebut bukan unsur esensial bagi pertumbuhan dan reproduksi sel. Ketika nutrisi mulai berkurang bakteri akan memasuki fase stasioner dan pada fase ini diduga terjadi pembentukan senyawa metabolit sekunder yang bersifat antimikroba.

Kurniawan (2008) menjelaskan, fase pertumbuhan bakteri dapat dibagi menjadi 4 fase, yaitu fase lag, fase logaritma (eksponensial), fase stasioner dan fase kematian. Fase lag merupakan fase penyesuaian bakteri dengan lingkungan yang baru. Lama fase lag pada bakteri sangat bervariasi, tergantung pada komposisi media, pH, suhu, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikroorganisme pada media sebelumnya. Ketika sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru maka sel mulai membelah hingga mencapai populasi yang maksimum. Fase ini disebut fase logaritma atau fase eksponensial.

Fase eksponensial ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Setiap sel dalam populasi membelah menjadi dua sel. Variasi derajat pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial ini sangat dipengaruhi oleh sifat genetik yang diturunkannya. Selain itu, derajat pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kadar nutrisi dalam media, suhu inkubasi, kondisi pH dan aerasi. Ketika derajat pertumbuhan bakteri telah menghasilkan populasi yang maksimum, maka akan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang mati dan jumlah sel yang hidup.

Fase stasioner terjadi pada saat laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya, sehingga jumlah bakteri keseluruhan bakteri akan tetap. Keseimbangan jumlah keseluruhan bakteri ini terjadi karena adanya pengurangan derajat pembelahan sel. Hal ini disebabkan oleh kadar nutrisi yang

berkurang dan terjadi akumulasi produk toksik sehingga mengganggu pembelahan sel. Fase stasioner ini dilanjutkan dengan fase kematian yang ditandai dengan peningkatan laju kematian yang melampaui laju pertumbuhan, sehingga secara keseluruhan terjadi penurunan populasi bakteri.

Untuk mengetahui pengaruh lama pemanenan *L. plantarum* yang berbeda terhadap bakteri *V. harveyi*, maka dilakukan analisa keragaman (sidik ragam). Hasil analisa sidik ragam dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Analisa Sidik Ragam

Sumber keragaman	Db	JK	KT	F Hitung	F 5 %	F 1 %
Perlakuan	6	560,25	93,375	133392,85**	2,85	4,46
Acak	14	0,001	0,0007			
Total	20	560,26				

Keterangan: ** = berbeda sangat nyata

Dari hasil analisa sidik ragam (Tabel 4), dapat diketahui bahwa pemberian *L. plantarum* dengan perbedaan waktu pemanenan memberikan hasil yang berbeda sangat nyata terhadap pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing perlakuan, dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf nyata 0,05% (selang kepercayaan 95%) maupun taraf nyata 0,01% (selang kepercayaan 99%). Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dapat dilihat pada Lampiran 2. Sedangkan perhitungan BNT dengan nilai BNT 5% dan 1% yang secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Uji BNT

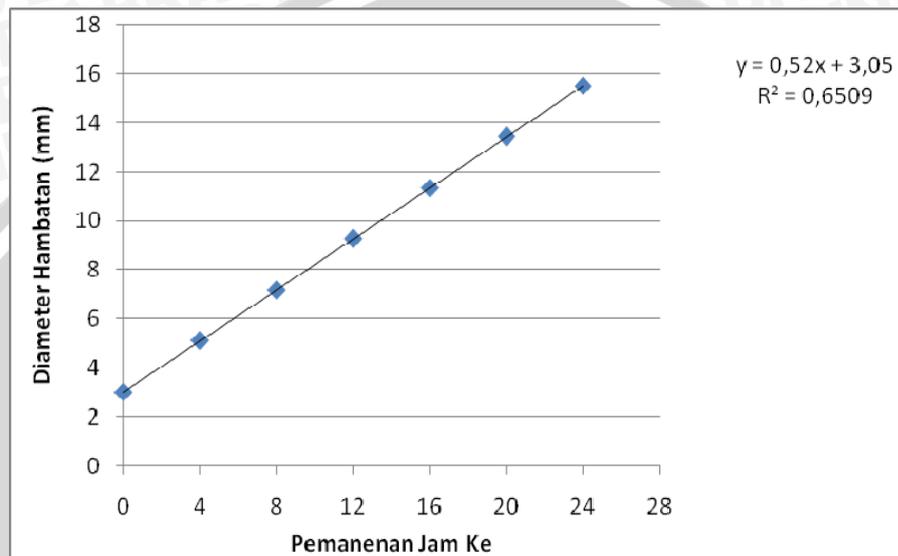
Rataan	A 6,01	B 6,03	C 6,09	D 6,14	E 6,21	F 15,28	G 19,28	Notasi
A 6,01	-	-	-	-	-	-	-	a
B 6,03	0,02 ^{ns}	-	-	-	-	-	-	a
C 6,09	0,008 ^{**}	0,06 ^{**}	-	-	-	-	-	b
D 6,14	0,13 ^{**}	0,11 ^{**}	0,05 [*]	-	-	-	-	c
E 6,21	0,2 ^{**}	0,18 ^{**}	0,12 ^{**}	0,07 ^{**}	-	-	-	d
F 15,28	9,27 ^{**}	9,25 ^{**}	9,19 ^{**}	9,14 ^{**}	9,07 ^{**}	-	-	e
G 19,28	13,27 ^{**}	13,25 ^{**}	13,19 ^{**}	13,14 ^{**}	13,07 ^{**}	4 ^{**}	-	f

Dari uji BNT, secara statistik dapat diketahui bahwa perlakuan A tidak memberikan pengaruh hasil yang berbeda nyata dengan perlakuan B. Perlakuan B memberikan pengaruh hasil yang berbeda nyata dengan perlakuan C, sedangkan perlakuan C sendiri memberikan pengaruh yang berbeda nyata dengan perlakuan D. Pada perlakuan D memberikan pengaruh hasil yang berbeda nyata pada perlakuan E, demikian halnya dengan perlakuan E terhadap perlakuan F, dan perlakuan F terhadap perlakuan G yaitu memberikan pengaruh hasil yang berbeda nyata.

Sehingga didapatkan urutan perlakuan terbaik adalah perlakuan G dengan pemanenan *L. plantarum* pada jam ke-24, kemudian perlakuan F dengan pemanenan *L. plantarum* pada jam ke-20, diikuti dengan perlakuan E pemanenan *L. plantarum* pada jam ke-16, perlakuan D dengan pemanenan *L. plantarum* pada jam ke-12, perlakuan C dengan pemanenan *L. plantarum* pada jam ke-8, perlakuan B dengan *L. plantarum* pemanenan pada jam ke-4, dan yang terakhir perlakuan A dengan pemanenan *L. plantarum* pada jam ke-0.

Untuk mengetahui hubungan antara pemanenan *L. Plantarum* pada jam yang berbeda dengan zona hambat yang terbentuk, digunakan analisa regresi. Secara lengkap perhitungan analisa regresi dapat dilihat pada Lampiran 2. Dari hasil

analisa regresi tersebut, diperoleh bentuk regresi linier dengan persamaan $Y = 0,52x + 3,05$ dan nilai koefisien korelasi $R^2 = 0,6509$. Grafik hubungan antara pemanenan *L. plantarum* pada jam yang berbeda zona hambat bakteri *V. harveyi* disajikan pada Gambar 9.



Gambar 9. Grafik Hubungan antara Pemanenan *Lactobacillus plantarum* pada Jam yang Berbeda dengan Diameter Daerah Hambat Bakteri *Vibrio harveyi*

4.4 Mekanisme Kerja Antimikroba *Lactobacillus plantarum*

Hasil uji cakram membuktikan bahwa *L. plantarum* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Hal ini didasarkan oleh kandungan senyawa dalam *L. plantarum* bersifat antimikroba. Senyawa antimikroba merupakan salah satu produk metabolit sekunder. Menurut Dhany (2008), *L. plantarum* merupakan spesies *Lactobacillus* yang mempunyai kemampuan untuk menghambat mikroorganisme patogen. *Lactobacillus* juga dapat menghasilkan H_2O_2 akibat adanya oksigen dan berfungsi sebagai antibakteri yang dapat menyebabkan adanya daya hambat terhadap pertumbuhan mikroorganisme lain. Selain itu *Lactobacillus* mempunyai kemampuan untuk menghasilkan antibiotik yang

disebut bakteriosin. Malik dan Kusmiati (2002) menambahkan BAL dan mengeksresikan senyawa yang mampu menghambat mikroorganisme patogen seperti H_2O_2 , diasetil, CO_2 , asetaldehid, d-isomer asam amino dan bakteriosin. Bakteriosin adalah Peptida antimikroba yang disintesis secara robosomal yang di hasilkan sejumlah bakteri dan mempunyai pengaruh bakterisidal dan bakteriostatik terhadap bakteri (Suparjo, 2008). Menurut Syafti (2008), bakteriosin adalah salah satu substansi yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat. Peranannya dapat menghambat atau membunuh bakteri lain. Secara umum bakteriosin juga stabil terhadap asam atau pH netral dan dapat beradaptasi dengan baik pada lingkungan tempat diproduksi. Bakteriosin bisa bersifat bakteriosidal atau bakteriostatik. Bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri asam laktat salah satunya memiliki kemampuan mengontrol pertumbuhan bakteri pembusuk dan patogen pangan. Bakteriosin yang dihasilkan bermacam-macam jenis tergantung dari strain yang menghasilkan atau organisme penghasilnya.

Bakteriosin sebagai substansi antimikrobia aksi penghambatannya belum jelas untuk diungkapkan. Namun secara skematis penghambatan dan aksi bakterisidal menurut Bhunia, *et al.*, (1990) model aksi penghambatan dan bakterisidal terhadap sel yang rentan adalah bakteriosin akan menempel pada reseptor membran sitoplasma berakibat fungsi membran sitoplasma rusak sehingga menyebabkan terjadinya pengeluaran material intraseluler, sel mengalami lisis dan akhirnya bakteri mati. Selain itu cara kerja zat antimikrobia menurut Pelczar dan Chan (1988), yaitu:

- ❖ Kerusakan pada dinding sel

Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk.

- ❖ Perubahan permeabilitas sel

Merusak membran yang berfungsi memelihara integritas komponen-komponen seluler sehingga mengakibatkan terhambatnya sel dan matinya sel.

- ❖ Perubahan molekul protein dan asam nukleat

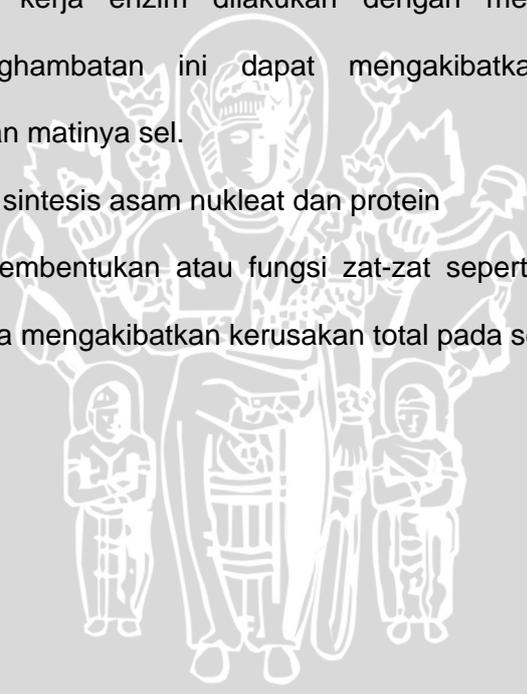
Mendenaturasikan protein dan asam-asam nukleat dapat merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali. Suhu tinggi dan konsentrasi pekat beberapa zat kimia dapat mengakibatkan koagulasi (denaturasi), *ireversibel* (tidak dapat balik) komponen-komponen selular yang vital.

- ❖ Penghambatan kerja enzim

Penghambatan kerja enzim dilakukan dengan mengganggu reaksi biokimia. Penghambatan ini dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme dan matinya sel.

- ❖ Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein

Mengganggu pembentukan atau fungsi zat-zat seperti DNA, RNA dan protein sehingga mengakibatkan kerusakan total pada sel.



5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka kesimpulan yang dapat diambil adalah sebagai berikut :

- Penggunaan bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* dengan pemanenan pada jam yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* secara in vitro.
- Hubungan antara *Lactobacillus plantarum* dengan pemanenan pada jam yang berbeda dengan diameter daerah hambatan terbentuk berupa regresi linier, dengan persamaan yaitu: $Y = 0,52 x + 3,05$ dan nilai koefisien korelasi r sebesar 0,806.
- *Lactobacillus plantarum* dengan pemanenan pada jam ke-0, ke-4, ke-8, ke-12, ke-16, ke-20 dan jam ke-24 bakteriostatik yaitu hanya menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi*

5.2 Saran

- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemanenan *Lactobacillus plantarum* pada jam yang berbeda setelah jam pemanenan ke-24 terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* secara in Vitro.
- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemanenan *Lactobacillus plantarum* pada jam yang berbeda terhadap daya hambat bakteri *Vibrio harveyi* secara in Vivo.

DAFTAR PUSTAKA

Agung, M.U.K. 2007. **Penelusuran Efektifitas Beberapa Bahan Alam Sebagai Kandidat Antibakteri Dalam Mengatasi Penyakit Vibriosis pada Udang Windu**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjajaran Jatinangor: hlm. 1-30.

Ali, I. 2008. **Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Antimikroba**. <http://www.iqbalali.com>. Diakses pada 15 November 2009 pukul 13:17:59 GMT.

Anonymous. 2003. **Bakteriologi Medik. Tim mikrobiologi**. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bayumedia Publishing. Malang. hlm. 373.

_____. 2008. ***Lactobacillus Plantarum***. <http://www.AXENZA.blogspot.com>

_____. 2009a. ***Vibrio harveyi* Clasification**. <http://en.wikipedia.org>. Diakses pada tanggal 10 November 2009 pukul 09:49:57 GMT.

_____. 2009b. **Teknik Pembenihan**. <http://restifishy.weebly.com> yang diakses pada tanggal 11 November 2009 pukul 02:26:22 GMT.

_____. 2009c. ***Lactobacillus plantarum* Clasification**. <http://en.wikipedia.org>. Diakses pada tanggal 09 November 2009 pukul 06:19:46 GMT.

_____. 2009d. **Bakteri *Lactobacillus* Sebagai Terapi HIV/AIDS**. <http://www.bkkbn.go.id>. Diakses pada tanggal 15 November 2009 pukul 05 :38 :31 GMT.

_____. 2009e. **TCBS Agar (*Vibrio* Selective Agar, Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar)**. <http://www.brpl.info>. Diakses pada tanggal 26 Februari 2009 pada pukul 21:43:03 GMT .

_____. 2009f. **Mc Farland Standards**. <http://en.wikipedia.org> yang diakses pada tanggal 8 Maret 2009 pada pukul 03:10:56 GMT.

_____. 2010a. ***Vibrio harveyi***. <http://www.google.co.id> yang diakses pada tanggal 17 Juni 2010 pada pukul 20:40:21 GMT.

_____. 2010b. ***Lactobacillus plantarumi***. <http://www.google.co.id> yang diakses pada 17 Juni 2010 pada pukul 21:05:32 GMT.

Barry, K.J. and N. R. Wainwright. 1997. **Biosynthetic Induction of Secondary Metabolite by a Marine Bacterium Under Nutritional Stress: Potential Role of the Complete Oxidation of an Organic Acid**, Biol. 193: 274-275.

- Bhunias, A.K., M.C. Johnson, and B. Ray. 1990. **Antigenic properties of Pediocins ACH Produced by *Pediococcus acidilactici***. 69: 211 - 215.
- Dedy. 2008. **Uji Biokimia Bakteri**. <http://www.dydear.multiply.com>. Diakses pada tanggal 21 April 2010 pukul 21:10:22 GMT.
- Demain, A.L. 1998. **Induction Of Microbial Secondary Metabolism**, International Microbio. 1:259-264.
- Dhany, M.E. 2008. **Bakteri Asam Laktat (*Lactobacillus plantarum*)**. <http://www.axenza.blogspot.com>. Diakses pada tanggal 8 April 2010 pukul 06:25:13 GMT.
- Ersam, T dan Chumaidah, N.F. 2006. **Isolasi dan Uji Antimikrobia Senyawa Kumarin dari Senyawa Polar pada Ekstrak Etil Asetat Garcinia Balica Miq (Mundu Alas)**. Prosiding Seminar Nasional Kimia VIII tanggal 8 Agustus 2006. FMIPA ITS Surabaya: hlm 5-11.
- Fahri, M. 2009. **Bakteri Patogen Pada Budidaya Perikanan Vibrio**. <http://elfahribima.blogspot.com>. Diakses pada tanggal 11 November 2009 pukul 16:36:56 GMT.
- Gobel, B. Risco, Zaraswati Dwyana, Asadi Abdullah. 2002. **Mikrobiologi Umum Dalam Praktek**. Universitas Hasanuddin. Makassar. <http://www.firmangalung.blogspot.com>. Diakses pada tanggal 27 Januari 2010 pukul 19:08:21 GMT.
- Guntoro, Dodit. A. 2009. **Pemanfaatan Bakteri Bacillus megaterium Sebagai Probiotik Untuk Meningkatkan Aktivitas Enzim Pencernaan Respon Pertumbuhan Udang Vannamei (*Litopenaeus Vannamei*)**. Tesis Program Studi Budidaya Perairan Minat Bioteknologi Perikanan dan Ilmu Kelautan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Hardiningsih, R., Napitupulu, R.N.R., Yulinery, T. 2006. **Isolasi Dan Uji Resistensi Beberapa Isolat Lactobacillus Pada pH Rendah**. 7: 15-17.
- Johnny, F., Prisdininggo, Roza, D. 2002. **Kasus Penyakit Infeksi Bakteri Pada Ikan Kerapu Di Keramba Jaring Apung Teluk Ekas, Kabupaten Lombok Timur, Nusa Tenggara Barat**. <http://ntb.litbang.deptan.go.id>.
- Kordi, M.G.H. 2004. **Penanggulangan Hama Dan Penyakit Ikan**. PT Rineka Cipta. Jakarta. 190 hlm.
- Krettiawan, H. 2009. **Sterilisasi**. <http://www.semestakoe.blogspot.com>. Diakses pada tanggal 1 Februari 2010 pada pukul 23:43:28 GMT.
- Kurniawan, R.A. 2008. **Fase Pertumbuhan Bakteri**. <http://www.chemicalzone.blogspot.com>. Diakses pada Tanggal 20 Januari 2010 pukul 19:11:36 GMT.

- Malik, A. dan Kusmiati. 2002. **Aktivitas Bakteriosin Dari Bakteri *Leuconostoc mesenteroides Pbac1* Pada Berbagai Media.** Universitas Indonesia. Depok. 6: 33-41.
- Martutik. 2005. **Studi Pertumbuhan Bakteri *Vibrio harveyi* dan *Vibrio alginilyticus* Pada Media TSA Dengan Penambahan CHITIN.** <http://digilib.umm.ac.id>. Diakses pada tanggal 06 April 2009 pukul 05:39:33 GMT.
- Nazir, M. 2005. **Metode Penelitian.** Ghalia Indonesia. Jakarta. 212 hal.
- Partic. 2008. **Dunia Mikro Uji Katalase.** <http://www.dunia-mikro.blogspot.com>. Diakses pada tanggal 07 April 2010 pukul 22:01:15 GMT.
- Pelczar, Michael J. and E C S Chan. 1986. **Dasar-dasar Mikrobiologi jilid I.** Penerjemah: R.S Hadioetomo, Teja I, S. Sutarmi, S.L Angka. Penerbit Universitas Indonesia Press. Jakarta. hlm 443.
- _____. 1988. **Dasar-dasar Mikrobiologi jilid 2.** Penerjemah: R.S Hadioetomo, Teja I, S. Sutarmi, S.L Angka. Penerbit Universitas Indonesia Press. Jakarta. hlm 997.
- Pradhika, E.I. 2009. **Daya Kerja Antimikroba Dan Oligodinamik.** <http://elmon-saurus.blogspot.com>. Diakses pada tanggal 23 September 2009 pukul 03:16:19 GMT.
- Prajitno, A. 2007. **Penyakit Ikan-Udang: Bakteri.** Universitas Negeri Malang. Malang. hlm 115.
- Rahayu, et al. 2002. **Penyiapan Starter Kering Bakteri Asam Laktat Halofilik Untuk Pengolahan Hasil Perikanan Fermentatif Beragam.** 22: 41-47.
- Rahmat. 2008a. **Bakteri *Vibrio sp.*** <http://www.rahmatsoft.web.ugm.ac.id>. Diakses pada tanggal 26 Oktober 2009 pukul 20:56:12 GMT.
- _____. 2008b. **Penyakit Vibriosis Udang Windu.** <http://www.rahmatsoft.web.ugm.ac.id>. Diakses pada tanggal 26 Oktober 2009 pukul 19:57:54 GMT.
- _____. 2009. **Bakteri Antagonis.** <http://www.rahmatsoft.web.ugm.ac.id> yang diakses pada tanggal 7 November 2009 pukul 20:54:10 GMT.
- Robertson, P. A. W., j. Calderon, L. Carrera, J. R. Stark, M. Zherdmant and B. Austin. 1998. **Experimental *Vibrio harveyi* Infections in *Penaeus vannamei* Larvae.** 22: 151-155.
- Rostini, I. 2007. **Peranan Bakteri Asam Laktat (*Lactobacillus plantarum*) Terhadap Masa Simpan Filet Nila Merah Pada Suhu Rendah.** Universitas Padjajaran Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Jatinangor: hlm13-24.

- Rozi, F.A. 2008. **Penerapan Budidaya Udang Ramah Lingkungan**. <http://faperta.uwm.ac.id/fokus>.
- Samsundari, s. 2005. **Parasit Dan Penyakit Ikan**. Universitas Muhammadiyah Malang. Malang. hlm 201.
- Sumantri, I. 2004. **Pengolahan Fruitghurt Dari Buah Melon Lewat Masak Dengan Fermentor *Lactobacillus bulgaricus***. Prosiding Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses 2004. Universitas Diponegoro Semarang: hlm 2-16.
- Santoso, E. 2009. **Pemanfaatan Bakteriosin Produksi *Lactobacillus plantarum* ED 22 Sebagai Pengawet Produk Perikanan**. Prosiding Seminar Nasional dan Gelar Teknologi PERTETA tanggal 8-9 Agustus 2009. Mataram: hlm 52-67.
- Suparjo. 2008. **Bakteriosin dan Perannya Dalam Ekologi Mikroba Rumen**. Fakultas Peternakan Universitas Jambi. Jambi. hlm 1-14.
- Supono, w. 2009. **Evaluasi Budidaya Udang Putih (*Litopenaeus vannamei*) Dengan Meningkatkan Kepadatan Tebar Di Tambak Intensif**. Prosiding Seminar Hasil dan Pengabdian Masyarakat Program studi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian 2008. Universitas Lampung: hlm 237-241.
- Suryabrata, S. 2006. **Metodologi Penelitian**. PT Raja Garfindo Persada. Jakarta. hlm 165.
- Sutoyo, L. 1998. **Penapisan Bakteri Asam Laktat Asal Berbagai Sumber Bahan Hewani dan Nabati Dalam Menghasilkan Bakteriosin**. Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian Bidang Ilmu Hayat di Bogor Tanggal 3 September 1998. Universitas Ilmu Hayat IPB: hlm. 38-50.
- Suwanto, A. 2002. **Strategi Baru dalam Mengendalikan Penyakit Infeksi :Memahami Bahasa Bakteri**. <http://www.kompas.com>. Diakses tanggal 15 Maret 2010 pukul 13:07:02 GMT.
- Syafti, I. 2008. **Mengenal Probiotik dan Manfaatnya Bagi Kesehatan**. <http://www.poltekkes-soeproen.ac.id>.
- Taufik, I., Koesharyan, I., Boer, D. R. 1996. **Pemanfaatan Fitoplanton Untuk Menekan Pertumbuhan Bakteri Bercahaya (*Vibrio harvey*)**. II: 2-5.
- Usmiati, S. 2009. **Penggunaan Bakteriosin Untuk Mempertahankan Kesegaran Daging Ayam**. <http://pasca.panen.litbang.deptan.go.id>. Diakses pada tanggal 26 Oktober 2009 pukul 03:06:32 GMT.
- Wibowo, M.S. **Biosintesis Senyawa Obat (FA-4206)** School of Pharmacy ITB, Bogor. (tidak diterbitkan).
- Widagdo, P. 2009. **Skrining Bakteri**. <http://puguh90.blogspot.com>. Diakses pada tanggal 20 September 2009 pukul 08:33:35 GMT.

Waluyo. 2008. **Teknik Metode Dasar Mikrobiologi**. Universitas Muhammadiyah Malang. Malang. hlm 366.

Yitnosumarto, S. 1991. **Percobaan: Perancangan, Analisis dan interpretasinya**. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. hlm 298.

Zhao, H. 2003. **Modulation of Phospholipase A2 Activity by Antimicrobial Peptides**. *Antimicrob*. University of Helsinki. Finland. 47: 965-971.

