

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI ANTAGONIS TERHADAP *Vibrio parahaemolyticus* PATOGEN PADA UDANG *Litopenaeus vannamei* DARI PRODUK PROBIOTIK DAN SEDIMEN MANGROVE DI REMBANG

Bunga Fajriani, Anto Budiharjo, Sri Pujiyanto
Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Semarang 50275 Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

Abstract

Shrimp is one of the main commodities in the aquaculture industry because it has high economic value and high demand product. The *Litopenaeus vannamei* shrimp have the advantage of being able to grow as fast as a tiger shrimp (3 g / wk), can be grown on a wide salinity range (0.5-45 ppt), lower protein requirement (20-35%) than tiger shrimp and *stylirostris* shrimp. *Vibrio parahaemolyticus* is a normal flora in the brackish waters environment which is pathogenic to shrimp commodities as well as in humans. The use of Probiotics as additional feed in the form of microbial cells intact widely used in shrimp farming as one effort to improve the quality of the environment and suppress the growth of pathogenic bacteria. One of the probiotic products used is super PS. This study aims to obtain bacterial isolate probiotic products that can suppress the growth of *Vibrio parahaemolyticus* bacteria. Isolation is also done on mangrove sediments as a comparable type of bacteria that can suppress the growth of pathogens. Methods used include isolation of bacterial probiotic and mangrove sediments, antagonistic test, and molecular identification with PCR methods (Polymerase Chain Reaction). The isolation result obtained by seven isolate bacteria of probiotic product and eleven isolate of mangrove sediment bacteria. One selected bacterial isolate from isolation of probiotic product that is IP 7 which able to suppress the growth of *Vibrio parahaemolyticus* with a diameter of clear zone 10.84 mm. The results of identification using the 16S rRNA gene sequence showed that IP 7 isolate had a similarity index of 92% with *Lysinibacillus cresolivorans*.

Keyword : *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio parahaemolyticus*, probiotics, antibacterial, gen 16S rRNA.

Abstrak

Udang merupakan salah satu komoditas utama dalam industri budidaya perikanan karena memiliki nilai ekonomi tinggi serta permintaan pasar tinggi. Udang *Litopenaeus vannamei* memiliki keunggulan yaitu dapat tumbuh secepat udang windu (3 g/minggu), dapat dibudidayakan pada kisaran salinitas yang lebar (0,5-45 ppt), kebutuhan protein yang lebih rendah (20-35%) dibanding udang windu dan udang *stylirostris*. *Vibrio parahaemolyticus* merupakan flora normal di lingkungan perairan payau yang bersifat patogen terhadap komoditas udang maupun pada manusia. Penggunaan Probiotik sebagai pakan tambahan berupa sel mikroba utuh banyak dimanfaatkan dalam budidaya udang sebagai salah satu upaya memperbaiki kualitas lingkungan dan menekan pertumbuhan bakteri patogen. Salah satu produk probiotik yang digunakan adalah super PS. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri produk probiotik yang mampu menekan pertumbuhan bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Isolasi juga dilakukan pada sedimen mangrove sebagai pembandingan jenis bakteri yang mampu menekan pertumbuhan patogen. Metode yang digunakan meliputi isolasi bakteri produk probiotik dan sedimen mangrove, uji aktivitas antibakteri, dan identifikasi secara molekuler dengan PCR (Polymerase Chain Reaction). Hasil isolasi diperoleh tujuh isolat bakteri produk probiotik dan sebelas isolat bakteri sedimen mangrove. Satu isolat

bakteri terpilih berasal dari isolasi produk probiotik yaitu IP 7 yang mampu menghambat pertumbuhan *Vibrio parahaemolyticus* dengan diameter zona hambat sebesar 10,84 mm. Hasil

identifikasi menggunakan sekuen gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat IP 7 memiliki indeks kemiripan sebesar 92% dengan *Lysinibacillus cresolivorans*.

Kata Kunci : *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio parahaemolyticus*, probiotik, antibakteri, gen 16S rRNA.

Pendahuluan

Akuakultur merupakan salah satu industri yang paling cepat berkembang dan memberikan kontribusi yang signifikan terhadap perekonomian dunia. Salah satu komoditas sektor perikanan yang bernilai ekonomi tinggi ialah udang, dengan kebutuhan pasar di manca negara yang luas dan terus meningkat (Garno, 2004; Maulina et al., 2012). Udang *vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) merupakan jenis udang yang dapat dibudidayakan di tambak selain udang windu (*Penaeus monodon* Fab.). Udang *vannamei* memiliki keunggulan, yaitu dapat hidup pada rentang salinitas lebar (euryhaline) dari 5 hingga 30 ppt, mampu beradaptasi terhadap kepadatan tinggi, serta tumbuh baik dengan pakan berprotein rendah. Demikian juga dengan perubahan salinitas khususnya pada salinitas tinggi, disamping itu udang *vannamei* juga mempunyai laju pertumbuhan yang relatif cepat (Rahardjo et al., 2003).

Berbagai kegagalan panen yang terjadi pada tambak udang di Indonesia menjadi fenomena yang sangat merugikan petani tambak. Kegagalan panen biasanya disebabkan serangan bakteri *Vibrio* yang mengakibatkan kematian udang dalam waktu yang cepat dan dalam jumlah yang besar. *Vibrio parahaemolyticus* merupakan flora normal di lingkungan perairan payau dan sebagai salah satu spesies *Vibrio* spp. yang bersifat patogen terhadap komoditas udang maupun pada manusia (Depaola et al., 2000). Bakteri ini merupakan jenis patogen yang menginfeksi dan menyebabkan penyakit pada saat kondisi udang lemah dan faktor

lingkungan yang ekstrim (Lopillo, 2000).

Terjadinya kematian udang akibat adanya serangan bakteri *Vibrio* membuat petani tambak udang mengalami kerugian yang besar. Potensi penyebaran *Vibrio* yang besar hendaknya segera diatasi dengan melakukan berbagai macam upaya penanggulangan. Menurut Badjoeri dan Widiyanto (2008), upaya penanggulangan penyakit di luar perbaikan kualitas lingkungan juga dapat dilakukan dengan cara melakukan pencegahan dan juga pengobatan. Pengobatan yang biasa dilakukan yaitu melalui pemberian bahan kimia atau sejenisnya, tetapi penggunaan bahan kimia ini mempunyai dampak yang kurang baik bagi kualitas lingkungan perairan tambak. Penggunaan antibiotik yang diaplikasikan pada perairan tambak secara rutin dalam pemanfaatannya sebagai sumber antibakteri ternyata menimbulkan sifat resistensi terhadap organisme target yang merugikan (Badjoeri dan Widiyanto, 2008). Oleh karena itu perlu adanya alternatif lain dalam perbaikan kualitas lingkungan dimana salah satunya yaitu dengan penggunaan probiotik.

Probiotik merupakan organisme hidup yang ditambahkan ke dalam sistem budidaya dengan maksud memperbaiki kualitas perairan tambak, memperbaiki penggunaan pakan, memperbaiki respon imun, dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Verschuere, 2000). Untuk mengetahui jenis bakteri yang memiliki sifat antagonistik terhadap *Vibrio parahaemolyticus* maka dilakukan penelitian mengenai isolasi dan

Identifikasi molekuler bakteri antagonis terhadap *Vibrio parahaemolyticus* patogen pada udang *Litopenaeus vannamei* dari produk probiotik dan sedimen mangrove di

Bahan dan Metode

Bahan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bacteriology UPT Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro, Semarang. Dimulai pada Desember 2016.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel sedimen mangrove, sampel probiotik PS, marine agar, marine broth, akuades, air laut, paper disc, minyak imersi, pewarna gram A, B, C, D, DNA sampel, marker, ddH₂O, primer 1429R, primer 27F, agarosa 1%, alkohol, kapas, kasa, spirtus, tissue, alumunium foil, wrap plastic, buffer TAE 1x, My Taq, gel red, serta bakteri uji *Vibrio parahaemolyticus* yang diperoleh dari stok dan koleksi Balai Besar Perikanan dan Budidaya Air Payau (BBPBAP), Jepara.

Metode

a. Isolasi Bakteri Probiotik

Isolasi bakteri yang berasal dari sampel probiotik dilakukan menggunakan teknik pengenceran bertingkat sebanyak 6x. Tahap selanjutnya sampel probiotik dari tiap pengenceran ditanam sebanyak 0,1 ml ke dalam media marine agar

untuk diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Tahap

Rembang. Penggunaan sedimen mangrove dalam penelitian ini adalah sebagai pembanding jenis bakteri antagonistik yang didapatkan dari hasil isolasi pada sampel probiotik. selanjutnya ditentukan Isolat berbeda untuk ditanam pada media marine broth dan diinkubasi kembali selama 24 jam dengan suhu 37°C.

b. Isolasi Bakteri Sedimen Mangrove

Sampel Sedimen mangrove yang digunakan untuk penelitian ini adalah sampel sedimen dari jenis mangrove *Avicennia marina* yang terdapat di area sekitar tambak di Rembang. Isolasi bakteri yang berasal dari sampel probiotik dilakukan dengan menggunakan teknik pengenceran bertingkat sebanyak 6x. Tiap pengenceran ditanam sebanyak 0,1 ml ke dalam media marine agar untuk diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Tahap selanjutnya ditentukan Isolat berbeda untuk ditanam pada media marine broth dan diinkubasi kembali selama 24 jam dengan suhu 37°C.

c. Uji Antagonistik Isolat Bakteri Probiotik dan Sedimen Mangrove

Uji antagonistik dilakukan pada isolat probiotik dan sedimen mangrove terhadap bakteri uji *Vibrio parahaemolyticus* patogen dengan menggunakan metode cakram Kirby-Bauer. Tahap awal yaitu kultur cair *Vibrio parahaemolyticus* yang didapatkan dari koleksi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau di campurkan ke dalam media marine agar dengan perbandingan 9:1 secara aseptis di dalam Laminar Air Flow untuk mengurangi resiko kontaminasi. Paper Disc diletakan dibagian tengah dari

media marine agar yang sudah berisi *Vibrio parahaemolyticus*. Paper Disc (kertas cakram) ditetesi dengan Kultur isolat dari probiotik komersial (Super PS) dan sedimen mangrove masing-masing 15 µl. Selanjutnya diinkubasi selama 24 sampai 72 jam pada suhu 37°C.

d. Pengukuran Zona Hambat

Daya hambat bakteri probiotik dan bakteri sedimen mangrove ditunjukkan dengan munculnya zona bening yang terlihat disekitar paper disc. Pengukuran zona hambat dilakukan menggunakan jangka sorong ketelitian 0,05 mm dengan pengulangan pengukuran sebanyak 4x. Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa apabila memiliki daerah hambatan 20 mm atau lebih berarti memiliki kekuatan atau daya antagonistik sangat kuat, bila daerah hambatan berkisar 10-20 mm berarti kuat, bila daerah hambatannya 5-10 mm berarti sedang dan bila daerah hambatannya 5 mm atau kurang dari 5 mm maka kemampuan antagonistik tergolong lemah (Davis dan Stout, 1971).

e. Pewarnaan Gram

Teknik pewarnaan Gram dilakukan dengan memberikan pewarna Gram A (kristal violet), B (lugol), C (Alkohol), dan D (Safranin) secara bertahap. Tahap awal pewarnaan Gram yaitu akuades ditetaskan pada kaca objek dan ditambahkan 1 ose biakan sampel, kemudian difiksasi di atas api bunsen. Selanjutnya pemberian pewarna Gram A, B, C, dan D secara bergantian. Tahap berikutnya adalah pengamatan

morfologi bakteri menggunakan mikroskop. Bila hasil pewarnaan diperoleh bakteri berwarna merah maka bakteri tersebut adalah Gram negative, sedangkan apabila diperoleh bakteri berwarna ungu maka bakteri tersebut termasuk ke dalam golongan Gram positif.

f. Ekstraksi DNA Bakteri

Ekstraksi DNA total dilakukan dengan menggunakan QIAamp® DNA Mini Kit. Koloni tunggal sampel bakteri sampel diletakkan di suhu ruang. 500 µl Buffer AL dimasukkan ke dalam tabung effendorf yang berisi isolat bakteri kemudian di vortex selama 30 detik. Selanjutnya sejumlah sampel diinversi sebanyak 5 kali kemudian masing-masing sampel di vortex kembali selama 30 detik. Sampel diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. 200 µl ethanol dingin dimasukkan ke dalam sampel kemudian di vortex selama 30 detik. Transfer larutan (500-600 µl) ke dalam tube penampung DNA (tube dengan filter). Sentrifuge selama 30 menit pada kecepatan 8000 rpm. Tube penampung DNA beserta supernatan dibuang selanjutnya dimasukkan ke tube penampung DNA baru. 500µl buffer AW1 ditambahkan, sentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Tube penampung DNA diganti baru. 500 µl buffer AW2 ditambahkan, disentrifuge selama 3 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Supernatan yang tertampung dibuang, kemudian disentrifuge kembali selama 1 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Tube penampung DNA dibuang dan tube filter dipindahkan ke tabung effendorf dengan penutup. 100 µl

buffer AE ditambahkan, sentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm.

Primer universal digunakan dalam penelitian ini yaitu berupa 27 F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan 1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Richard dan Farooq, 2001). Teknik PCR dilakukan menggunakan tube mikrofuge 0,5 ml. Total volume campuran reaksi adalah 25 µl yang mengandung 0,5 µl primer universal 27 F; 0,5 µl primer 1492 R, 4 µl DNA template, 12,5 µl My TAQ Hs Red DNA, dan 7,5 µl ddH₂O. Amplifikasi PCR dilakukan dengan kondisi predenaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 40 detik, annealing pada suhu 55°C selama 40 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit dengan final ekstensi pada suhu 72°C selama 5 menit dengan jumlah 30 siklus. Hasil amplifikasi akan dibandingkan dengan kontrol negatif.

Produk PCR dirunning dalam 1% gel agarosa dengan penambahan Gelred. 4 µl produk PCR dimasukkan ke dalam sumuran agarosa. Elektroforesis dilakukan selama 40 menit dengan tegangan 100 volt. Pengamatan migrasi DNA dilakukan menggunakan lampu UV transluminator.

g. Analisa Sekuen

Sekuens yang diperoleh dianalisis dengan menyelaraskan urutan nukleotida dengan sekuens yang diduga terdapat dalam gen bank menggunakan program MEGA 6.0, kemudian daerah yang memiliki kesamaan urutan sekuens dianalisis kembali menggunakan penyejajaran

yang terdapat dalam fasilitas penyejajaran Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) untuk menentukan persentase kesamaan pasangan basa dengan isolat referensi yang terdapat di gen bank.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi Bakteri Probiotik dan Sedimen mangrove

Tahap awal isolasi dilakukan dengan pengenceran sampel probiotik dan sedimen mangrove ke dalam akuades steril secara bertingkat mulai dari pengenceran 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, sampai 10⁻⁶. Masing-masing pengenceran selanjutnya ditanam pada media marine agar dengan masa inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam hingga dapat dilihat koloni bakteri yang tumbuh pada media tersebut.

Hasil isolasi bakteri sampel sedimen mangrove dan probiotik masa inkubasi 24 jam menunjukkan adanya pertumbuhan koloni bakteri pada media tumbuh. Hasil pengamatan koloni bakteri meliputi warna, bentuk, tepian, dan elevasi koloni ditemukan 11 koloni bakteri yang berbeda dari sedimen mangrove dan 7 koloni bakteri yang berbeda dari produk probiotik dengan karakter morfologi seperti yang dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Morfologi Isolat Bakteri Probiotik Super PS

Tabel 2. Morfologi Isolat Bakteri Sedimen

Pengamatan Morfologi Isolat Bakteri Probiotik Super PS				
Isolat	Warna	Bentuk	Tepian	Elevasi
IP 1	Kuning	Bulat	Rata	Cembung
IP 2	Putih Gading	Bulat	Rata	Cembung
IP 3	Tepi Putih, Center kuning	Bulat	Rata	Cembung
IP 4	Putih Gading	Tak Beraturan	Rata	Datar
IP 5	Transparan	Tak Beraturan	Bergerigi	Cembung
IP 6	Putih	Bulat	Bergerigi	Cembung
IP 7	Putih Gading	Bulat	Bergerigi	Cembung

Isolat bakteri berbeda yang didapat dari hasil isolasi sedimen mangrove dan probiotik di seleksi untuk menentukan isolat yang paling berpotensi menekan pertumbuhan bakteri patogen, *Vibrio parahaemolyticus*. Tahap

Pengamatan Morfologi Isolat Bakteri Sedimen Mangrove				
Isolat	Warna	Bentuk	Tepian	Elevasi
IS 1	Putih Gading	Bulat	Rata	Cembung
IS 2	Transparan	Tak Beraturan	Rata	Datar
IS 3	Transparan	Bulat	Rata	Datar
IS 4	Putih	Tak Beraturan	Rata	Cembung
IS 5	Kuning	Bulat	Rata	Cembung
IS 6	Orange Muda	Bulat	Rata	Cembung
IS 7	Transparan Bergaris	Bulat	Rata	Cembung
IS 8	Transparan, Center keruh	Bulat	Rata	Cembung
IS 9	Tepi Keruh, Center Transparan	Bulat	Rata	Cembung
IS 10	Kuning Pekat	Bulat	Rata	Cembung
IS 11	Putih Gading	Tak Beraturan	Bergerigi	Cembung

seleksi dilakukan dengan melakukan uji antagonistik masing-masing isolat terhadap bakteri uji *Vibrio parahaemolyticus*. Isolat terpilih merupakan isolat yang memiliki aktivitas penghambatan terbesar, ditandai dengan terbentuknya zona

bening di sekitar koloni pada media marine agar yang mengandung bakteri uji *Vibrio parahaemolyticus*. Adanya Zona bening mengindikasikan isolat memiliki kemampuan menghasilkan senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji.

Uji Antagonistik

Hasil penelitian uji antagonistik tertinggi masa inkubasi 24, 48 dan 72 jam ditunjukkan oleh isolat bakteri sampel probiotik IP 7 dengan rata-rata diameter zona bening 10,84 mm, sedangkan isolat yang didapatkan dari hasil isolasi sedimen mangrove tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan.

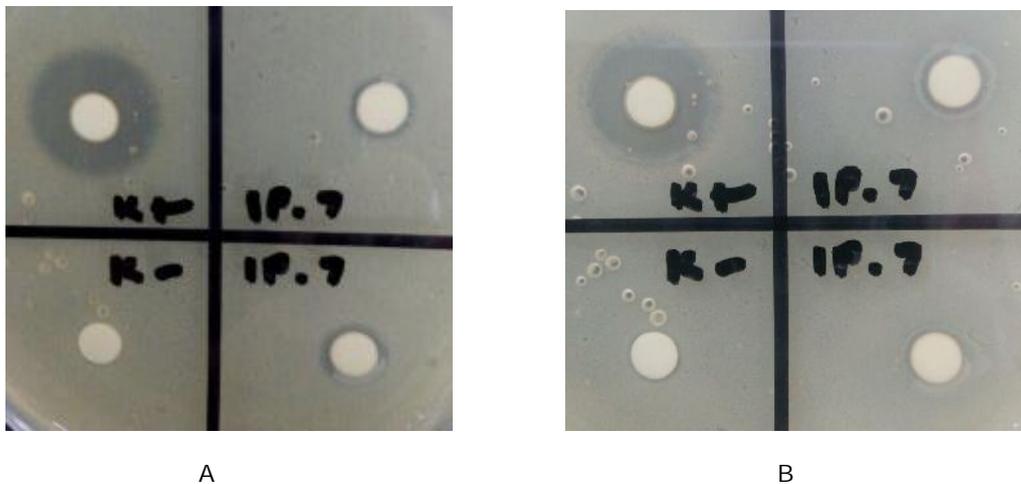


Gambar 1. Daya hambat Isolat terpilih IP 7 terhadap *V. parahaemolyticus*.

Untuk memastikan sifat antagonistik isolat IP 7 terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus* dilakukan pengujian antagonistik kembali dengan perbandingan bakteri uji dan media tumbuh 1:19 disertai dengan penggunaan kontrol negatif dan kontrol positif masing-masing 10µl. Kontrol negatif dilakukan dengan

pemberian akuades steril sedangkan kontrol positif berupa kloramfenikol

seperti yang dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Uji antagonistik isolat IP 7 terhadap *V. parahaemolyticus* 24 jam masa inkubasi (A) dan 48 jam masa inkubasi (B) suhu 37°C dengan perbandingan bakteri dan media.

Perhitungan daya hambat dilakukan dengan menggunakan jangka sorong ketelitian 0,05 mm. Hasil uji antagonistik isolat bakteri probiotik IP 7 terhadap *Vibrio parahaemolyticus* menunjukkan rata-rata daya hambat 1,49 mm pada masa inkubasi 24 jam, dan 2,50 pada masa inkubasi 48 jam. Pengujian dengan kontrol positif menunjukkan rata-rata daya hambat 13,49 mm pada masa inkubasi 24 jam, dan 13,73 mm pada masa inkubasi 48 jam, sedangkan pengujian dengan kontrol negatif tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan bakteri uji. Frazier et al., (1981), Noaman et al., (2014), menjelaskan bahwa beberapa faktor yang dapat mempengaruhi besar kecilnya aktivitas penghambatan zat antibakteri antara lain: 1) jenis, umur dari bakteri penghasil bakteriosin dan bakteri uji; 2) konsentrasi zat antimikroba dan jumlah inokulum atau kepadatan bakteri uji; 3) resistensi dari bakteri terhadap substansi zat antimikroba terkait dengan perbedaan dinding sel dari bakteri uji; dan 4) kadar substansi

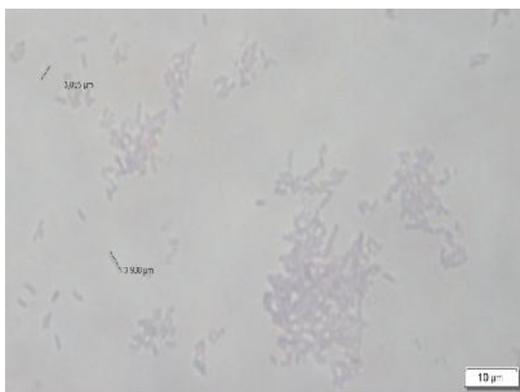
aktif atau gugus fungsi dari substansi senyawa antimikroba.

Nguyen et al., (2014) dan Sahoo et al., (2014) menjelaskan bahwa senyawa antibakteri yang dihasilkan dari perairan umumnya memiliki sifat penghambatan spektrum sempit yang artinya kemampuan penghambatan hanya terjadi pada tingkat kekerabatan yang dekat dengan bakteri penghasil antibakteri sendiri dan beberapa senyawa antibakteri dari golongan Gram positif perairan memiliki aktivitas penghambatan spektrum luas dan dapat digunakan untuk mengatasi patogen pada budidaya perikanan.

Pewarnaan Gram

Jenis bakteri Gram isolat IP 7 dapat dilihat dengan melakukan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram berfungsi untuk mengetahui jenis bakteri berdasarkan dinding selnya. Pewarnaan Gram menggunakan empat jenis pewarna, meliputi kristal ungu (Gram A) yang berfungsi

sebagai zat warna primer; iodine (Gram B) berfungsi sebagai penguat warna kristal ungu; alkohol aseton (Gram C) berfungsi untuk melarutkan lemak; safranin (Gram D) berfungsi sebagai pewarna sekunder. Pengamatan bakteri dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000X dengan penambahan minyak imersi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa Isolat IP 7 merupakan bakteri berbentuk batang dengan panjang sel berkisar 3,380 μm dan mengekspresikan warna biru keunguan sehingga isolat IP 7 tergolong bakteri Gram positif seperti pada Gambar 3.



Gambar 3. Morfologi isolat IP 7 secara mikroskopis perbesaran 1000x

Penggunaan bakteri *Vibrio parahaemolyticus* sebagai bakteri uji karena bakteri ini merupakan salah satu bakteri patogen pada budidaya perikanan. Keberadaan *Vibrio parahaemolyticus* dengan jumlah yang banyak pada perairan dapat menginfeksi udang *Litopennaeus vannamei* hingga mengakibatkan penyakit dan kematian. Menurut Goarant et al., (1999), beberapa spesies patogen *Vibrio* seperti *V. harveyi* dan *V. parahaemolyticus*. *V. harveyi* dan *V. parahaemolyticus* merupakan bakteri yang menginfeksi udang dan umumnya disebut dengan patogen oportunistik yang menyebabkan penyakit pada udang.

Hasil pengamatan dengan mikroskop menunjukkan bahwa bakteri *Vibrio parahaemolyticus* merupakan bakteri Gram negatif dengan panjang sel 3,319 μm yang umumnya terdeteksi pada air, sedimen, plankton, produk perikanan (krustasea, ikan dan moluska).



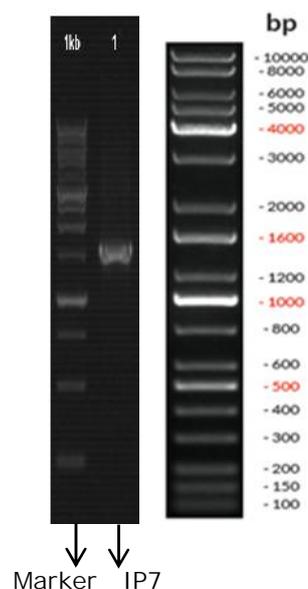
Gambar 4. Morfologi *V. parahaemolyticus* secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram perbesaran 1000x.

Identifikasi Molekuler

Identifikasi secara molekuler isolat IP 7 sebagai isolat potensial penghambat pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio parahaemolyticus* dilakukan dengan teknik PCR (Polymerase Chain Reaction). Tahap pengujian molekuler diawali dengan melakukan isolasi DNA bakteri menggunakan QIAamp® DNA Mini Kit. Hasil isolasi DNA diuji secara kuantitatif dan kualitatif untuk mengetahui tingkat kemurniannya. Hasil ekstraksi DNA menunjukkan nilai kemurnian 2,06 dan konsentrasi 228,3. Menurut Sambrook dan Russell (1989), Hasil isolasi DNA yang kemurniannya baik memiliki nilai perbandingan A260/A280 sebesar 1.8-2.0. Beberapa DNA isolat berada diluar rentang tersebut kemungkinan disebabkan oleh adanya kontaminasi dari RNA atau protein lainnya (Rahayu, 2016). Amplifikasi DNA

dilakukan pada daerah gen 16S rRNA . Menurut Campbell et al., (2002), terdapat tiga jenis rRNA pada prokariotik yaitu 16S, 23S, dan 5S. Diantara ketiganya, 16S rRNA yang paling sering digunakan baik pada eukariot maupun prokariot.

Produk PCR selanjutnya dianalisis dengan menggunakan elektroforesis. Tahap Elektroforesis diawali dengan pembuatan gel agarose 1% yaitu dengan mencampurkan agarose 1 gr ke dalam larutan TAE 100 ml, kemudian di homogenkan menggunakan microwave dan ditambahkan GelRed™ 1 µl. Campuran agarose dicetak pada chamber hingga struktur menyerupai gel. Marker yang digunakan untuk analisis elektroforesis adalah KAPPA universal ladder. DNA template dan marker dengan perbandingan 4:1 dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose. Proses elektroforesis dilakukan selama 40 menit dengan tegangan 100 V. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel documentation seperti pada Gambar 5.



Gambar 5. Visualisasi hasil amplifikasi gen 16S rRNA isolat IP 7 pada konsentrasi gel agarosa 1% dengan menggunakan Kappa Universal ladder

Hasil amplifikasi gen 16S rRNA, diketahui isolat IP 7 memiliki panjang DNA sekitar 1.500 bp. Hal ini sesuai dengan pernyataan Brown (1992) yang menjelaskan bahwa gen 16S rRNA berukuran panjang antara 1500 hingga 1550 bp dan kaya akan basa nitrogen guanin dan sitosin (G+C) Gen ini juga memiliki daerah konservatif yang umumnya memiliki beberapa ukuran kisaran 500-540 bp yang letaknya tersebar. Proses penyandian protein dilakukan melalui penentuan susunan nukleotida molekul RNA, yang selanjutnya susunan nukleotida tersebut diterjemahkan ke dalam susunan asam amino dari rantai polipeptida protein sehingga diperoleh produk 16S rRNA.

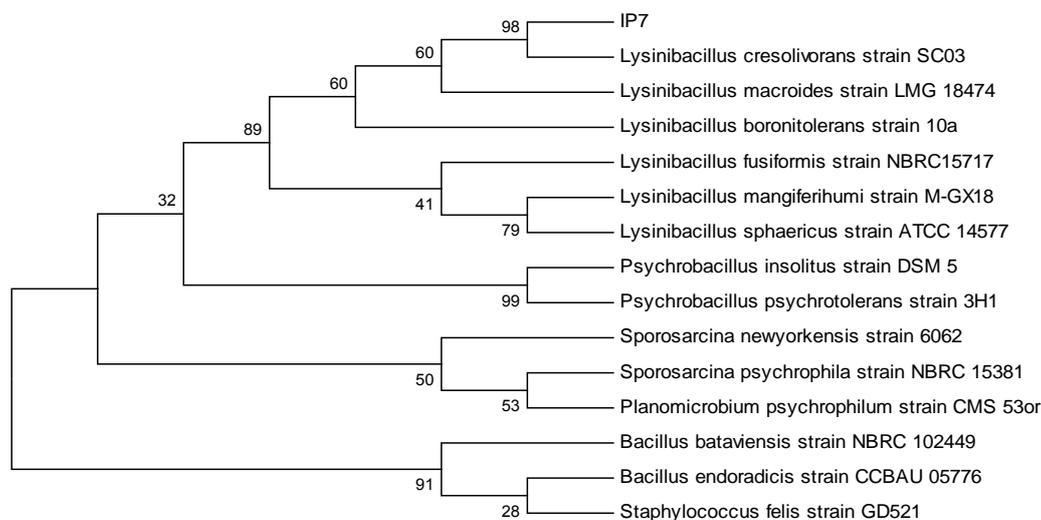
Tahap sekuensing Produk PCR dilakukan untuk mengetahui urutan basa nukleotida isolat IP 7. Sekuen DNA adalah informasi penting untuk mengetahui identitas, fungsi, dan modifikasi suatu fragmen DNA atau gen. Menurut (Brown 1992),

sekuensing DNA adalah proses penentuan urutan basa suatu DNA. Proses ini menggunakan prinsip reaksi polimerisasi DNA secara enzimatik.

Hasil analisis sekunesing DNA isolat IP 7 dengan menggunakan BLAST diperoleh hasil bahwa isolat ini memiliki homologi atau tingkat kemiripan sebesar 92% dengan spesies *Lysinibacillus cresolivorans* strain SC03 yang memiliki max score 287, total score 287, query cover 51%, dan e-value $3e-77$.

Pohon filogenetik dibuat untuk mengetahui kekerabatan antara isolat IP 7 dengan spesies yang diduga memiliki tingkat kemiripan

berdasarkan urutan basa nukleotidanya, dalam hal ini adalah *Lysinibacillus cresolivorans* strain SC03. Menurut Claverie dan Notredame (2007), Filogenetik adalah filogeni yang sesungguhnya membandingkan gen-gen yang ekuivalen yang datang dari beberapa spesies untuk merekonstruksi pohon kehidupan (genealogic tree) dari spesies-spesies ini dan mengetahui siapa yang relatif berkerabat dekat dengan yang lain. Tujuan filogeni adalah merekonstruksi sejarah kehidupan dan menjelaskan adanya keragaman makhluk hidup. Pohon filogenetik dari isolat IP 7 dengan spesies *Lysinibacillus cresolivorans* seperti pada Gambar 6.



Gambar 6. Pohon filogenetika berdasarkan perbandingan sekuens 16S rRNA

Hasil dari pada pohon filogenetik yang dibuat berdasarkan perbandingan sekuens gen 16S rRNA, menunjukkan bahwa tipe galur isolat IP 7 lebih dekat dengan *Lysinibacillus cresolivorans*. Isolat IP 7 dengan *Lysinibacillus cresolivorans* menunjukkan nilai bootstrap 98.

Bootstrap adalah metode yang menguji seberapa baik set data model. Jika nilai bootstrap rendah maka sekuens seharusnya dikeluarkan dari analisis untuk mendapatkan pohon filogenetik yang dapat dipercaya.

Lysinibacillus cresolivorans adalah bakteri dari golongan Gram-positive, memiliki spora yang berbentuk bulat, dan termasuk genus dalam famili Bacillaceae. Organisme dalam genus ini sebelumnya dianggap sebagai anggota genus *Bacillus*, namun status taksonomi mikroorganisme ini diubah menjadi genus *Lysinibacillus* pada tahun 2007 (Ahmed et al., 2007). Dibandingkan dengan *Bacillus*, *Lysinibacillus* mengandung lisin dan aspartat pada dinding sel peptidoglikannya yang didiagnostik sebagai asam amino, berbeda dengan asam meso-diaminopimelik dalam genus *Bacillus* (Miwa et al., 2009). *Lysinibacillus cresolivorans* umumnya ditemukan di tanah (Ahmed et al., 2007). Isolat genus *Lysinibacillus* hasil isolasi dari lingkungan merupakan kontrol biologis potensial bagi patogen (Melnick, 2011).

Sebuah studi dari Guangzhou, Cina, melaporkan bahwa bakteri *Lysinibacillus cresolivorans* memiliki kemampuan dalam hal biodegradasi substrat m-cresol dan piridin. Fenol dan senyawa N-heterocyclic ditemukan pada air limbah, terutama di limbah petrokimia. *Lysinibacillus cresolivorans* merupakan bakteri yang mampu melakukan biodegradasi fenol berdasarkan interaksi substrat m-cresol dan piridin sebagai substrat tunggal dan ganda. Turunan-turunan fenol, m-cresol, telah banyak dimanfaatkan sebagai resin fenolik, antiseptik gigi, preparat insulin, herbisida, prekursor antioksidan dan bahan peledak. Pengaruh dari adanya kandungan m-cresol di lingkungan sudah lama

dikenal, bila air limbah yang mengandung m-cresol memasuki badan air penerima, kerusakan yang cukup besar pada organisme air dapat terjadi karena toksisitasnya (Zhou et al., 1996).

Kesimpulan

Diperoleh 7 isolat bakteri yang berasal dari produk probiotik dan 11 isolat bakteri dari sedimen mangrove. Terdapat satu isolat bakteri terpilih berasal dari hasil isolasi produk probiotik yaitu isolat IP 7 yang mampu menghambat pertumbuhan *Vibrio parahaemolyticus* dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 10,84 mm. Hasil identifikasi menggunakan sekuen gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat IP 7 memiliki indeks kemiripan sebesar 92% dengan *Lysinibacillus cresolivorans*.

Daftar Pustaka

- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., & Fujiwara T. 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and Transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic Evolution Microbiol.*
- Badjoeri, M., dan Widiyanto. 2008. Penggunaan Bakteri Nitrifikasi untuk Bioremediasi dan Pengaruhnya Terhadap Konsentrasi Amonia dan Nitrit di Tambak Udang. *Jurnal Oseanologi dan Limnologi.*

- Brown, T. A. 1992. Second Edition Genetics: Molecular Approach. London: Chapman & Hall.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., & Mitchell, L. G. 2002. Biologi Edisi Kelima. Lestari R, penerjemah. Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari: Biology. Fifth Edition
- Claveri, J. M., dan C. Notredame. 2007. Second Edition Bioinformatics for Dummies. New York: Wiley Publishing, Inc.
- Davis and stout. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. Journal of Microbiology.
- DePaola, A., Kaysner, C. A., Bowers, J. C., & Cook, D. W. 2000. Environmental Investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in Oysters Following Outbreaks 83 in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). Journal of Application Environment Microbiol.
- Frazier, W. C., and Wasthoff, D. C. 1981. Food Microbiology. New Delhi (IN): Tata Mc Graw-Hill
- Garno, Y. S. 2004. Pengembangan Budidaya Udang dan Potensi Pencemarannya Pada Perairan Pesisir. Jurnal Teknik Lingkungan P3TL-BPPT.
- Goarant, C., Merien, F., Berthe, F., Mermoud, I., & Perolat, P. 1999. Arbitrarily Primed PCR to Type *Vibrio* spp. Pathogenic for Shrimp. Journal Application Environment Microbiol.
- Lopilto, R. 2000. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Heterotropik pada Tambak yang Antagonis Terhadap *Vibrio harveyi* dan *Vibrio parahaemolyticus*. Pekanbaru : Faperikan Unri.
- Maulina, I., Handaka A. A., & Riyantini I. 2012. Analisis Prospek Budidaya Tambak Udang di Kabupaten Garut. Jurnal Akuatika.
- Melnick, R. L., Suárez, C., Bailey, B. A., & Backman, P. A. Isolation of Endophytic Endospore-forming Bacteria from *Theobroma Cacao* as Potential Biological Control Agents of *Cacao* diseases. Journal Biology Control .
- Miwa, H., Ahmed, I., Yokota, A., & Fujiwara, T. 2009. *Lysinibacillus parviboronicapiensis* sp. nov., a Low-boron-containing Bacterium Isolated from Soil. Int. J. System Evolution Microbiol.
- Nguyen, D. V., Pham T, Nguyen. T. H., & Nguyen, T. T. 2014. Screening of Marine Bacteria with Bacteriocin like Activities and Probiotic Potential for Ornate Spiny Lobster (*Panulirus ornatus*) Juveniles. Journal Fish Shell Immun.
- Noaman, N. H., Fattah, A., Khaleata, M., Zaky, S. H. 2004. Factor Affecting Antimicrob Activity of *Synechococcus leopoliensis*. Journal Microbiol Res.
- Rahardjo S. P., Sutikno., Subiyanto., & Adiwijaya. 2003. Petunjuk Teknis Budidaya Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) Sistem Sirkulasi Tertutup. Jakarta: Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya,

Departemen Kelautan dan Perikanan.

Aquaculture: Journal Aquacult Rese.

Rahayu, A. T. 2012. Formulasi Produk Hayati Berbasis Aktinomiset Endofit sebagai Pemacu Pertumbuhan Tanaman Padi. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.

Richard, A. Long., and Farooq, Azam. 2001. Antagonistic Interactions Among Marine Pelagic Bacteria. *Journal Applied Environment Microbiol.*

Sahoo, T. K., Jena, P. K., Patel, A. K., & Seshadri, S. 2014. Bacteriocin and their Application for The Treatment of Bacterial Diseases in

Sambrook, D. and W, Russel. 2001. Third Edition *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Verscheure, L., Rombaut, G., Sorgeloos, B., & Vestraete, W. 2000. Probiotik Bacteria as Biological Control Agents In Aquaculture. *Journal Microbial and Mol.Biol.*

Zhou, J., Bruns, A., & Tiedje, J. M. 1996. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Journal Appl Environ Microb.*