

UJI AKTIVITAS BAKTERIOSIN ISOLAT *Lactobacillus sp* DALAM MENGHAMBAT PERTUMBUHAN *Pseudomonas aeruginosa*

Bias Relati Ronanur

NIM P17334111019

Program D III Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Bandung

Email : biasrelatironanur@gmail.com

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen and a bacterial major caused of nosocomial infection. Lactic acid bacteria (LAB) produced metabolite that well known as bacteriocin. Bacteriocin has bactericidal activity, bacteriostatic, and therapeutic effect. The purpose of this research to determine the activity of supernatant bacteriocin *Lactobacillus sp* in inhibit the growth of *P. aeruginosa* and to know bacteriocin of *Lactobacillus sp* which has the highest activities in inhibit the growth of *P. aeruginosa*. The kind of this research is an experiment using two methods that was agar diffusion and microdilution. The result showed that the supernatant of bacteriocin *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, and *L. casei* with diameter inhibition zone 11.4 ± 0.64 mm, 11.4 ± 0.62 and 9.5 ± 0.28 . MIC values of the three samples is 6.25%, MBC value of *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* is 12.5%, and *L. casei* is 25%. The result showed that supernatant bacteriocin of *Lactobacillus sp* has activity in inhibiting the growth of *P. aeruginosa* with the highest activity was shown by bacteriocin *L. acidophilus* and *L. bulgaricus*. Suggestion for further research to use a single or a combination of bacteriocin then tested the activities to other pathogenic bacteria.

Keywords : Bacteriocin, *Lactobacillus sp*, *Pseudomonas aeruginosa*

1. PENDAHULUAN

Infeksi nosokomial adalah infeksi yang terjadi pada pasien rawat inap di rumah sakit. *P.aeruginosa* merupakan organisme utama penyebab infeksi nosokomial dengan persentase sebesar 13% menurut penelitian yang dilakukan di rumah sakit dr. Moewardi Fakultas Kedokteran UNS Surakarta tahun 2003. *P.aeruginosa* merupakan patogen oportunistik, yaitu memanfaatkan kerusakan pada mekanisme pertahanan inang untuk memulai suatu infeksi.^(1, 2)

P. aeruginosa berbahaya secara klinik karena resisten terhadap berbagai antibiotik dan memiliki kemampuan untuk berkembang pada tingkat *multi drug resisten* (MDR). Penelitian tentang pola kepekaan *P. aeruginosa* terhadap beberapa antibiotika yang telah dilakukan di RSUP dr. Kariadi Semarang tahun 2010, dikemukakan bahwa *P. aeruginosa* telah mengalami tingkat

resistensi tertinggi terhadap kloramfenikol, tetrasiklin dan sefotaksime. Fenomena tersebut memicu untuk menemukan alternatif antibakteri alami yang aman dan mampu menghambat resistensi.^(2, 3)

Bakteri asam laktat (BAL) dapat menghasilkan beberapa senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba salah satu diantaranya yaitu bakteriosin sehingga berpotensi sebagai pengawet makanan alami serta untuk tujuan medis.

BAL adalah kelompok bakteri Gram positif berbentuk kokus atau batang, tidak membentuk spora, pada umumnya tidak motil, tidak membentuk pigmen bersifat anaerob tapi aerotoleran, katalase negatif, tahan terhadap asam, dapat tumbuh pada temperatur antara 5 – 50° C serta mampu membentuk asam laktat dari metabolisme karbohidrat. Terbentuknya asam laktat oleh BAL dapat menyebabkan penurunan pH sehingga pertumbuhan bakteri

gram positif dan gram negatif yang tidak tahan pH rendah akan terhambat. Bakteriosin umumnya dihasilkan oleh BAL diantaranya dari genus *Lactobacillus sp.*^(4, 5)

Studi yang dilakukan oleh Kusumawati (2000) bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL dapat menghambat pertumbuhan bakteri pada bahan pangan sehingga dapat digunakan sebagai pengawet untuk meningkatkan keamanan bahan pangan terhadap kontaminasi bakteri.⁽⁴⁾

Bakteriosin potensial sebagai alternatif pengganti antibiotik karena memiliki aktivitas bakterisidal, bakteriostatik serta efek terapeutik. Kelebihan bakteriosin antara lain bakteriosin merupakan bahan pengawet makanan tidak beracun, mudah terurai, dan tidak membahayakan bagi mikroba usus, stabil pada pemanasan, pH rendah, refrigerasi dan pembekuan, dan tahan terhadap garam dan enzim. Meskipun dalam konsentrasi rendah, bakteriosin memiliki kemampuan antibakteri yang tinggi.^(5, 6)

Bakteriosin adalah peptida antibakteri yang disintesis secara ribosomal yang dihasilkan sejumlah bakteri baik Gram positif maupun Gram negatif yang bersifat bakterisidal dan bakteriostatik terhadap bakteri lain terutama bakteri dengan strain yang berdekatan dengan bakteri penghasilnya

Kelebihan bakteriosin antara lain bukan merupakan bahan toksik, mudah mengalami degradasi karena merupakan senyawa protein, tidak membahayakan mikroflora usus karena mudah dicerna oleh enzim saluran pencernaan, dapat mengurangi penggunaan bahan kimia, dan penggunaannya fleksibel dan stabil terhadap pH dan suhu sehingga tahan terhadap proses pengolahan yang melibatkan asam dan basa, serta kondisi panas dan dingin.

Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian mengenai uji aktivitas bakteriosin isolat *Lactobacillus sp* dalam menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa*.

2. METODE PENELITIAN

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen dengan dua metode yaitu difusi agar dan mikrodifusi untuk menentukan nilai

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) daya hambat supernatan bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus sp* terhadap pertumbuhan *P.aeruginosa*.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Bandung Jurusan Analis Kesehatan pada bulan Mei sampai dengan bulan Juni 2014.

Populasi yang digunakan adalah BAL genus *Lactobacillus sp* yang berasal dari Laboratorium Teknologi Pangan Institut Pertanian Bogor. Sampel adalah isolat murni *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, dan *L. casei* yang diperoleh dari Laboratorium Teknologi Pangan Institut Pertanian Bogor. Bakteri uji yang digunakan adalah isolat murni *P. aeruginosa* yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi-Toksikologi Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung.

Data dalam penelitian ini merupakan data primer. Data primer tersebut diperoleh dari hasil pengamatan daya hambat bakteriosin terhadap pertumbuhan *P.aeruginosa* pada media Mueller Hinton Agar dan Mueller Hinton Broth. Pengujian daya hambat bakteriosin terhadap pertumbuhan *P.aeruginosa* masing-masing dilakukan sebanyak 3 kali (triplo).

Pengolahan data diperoleh dari hasil pengamatan daya hambat bakteriosin terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa*. Pengujian daya hambat bakteriosin terhadap pertumbuhan *P.aeruginosa* masing-masing dilakukan sebanyak 3 kali (triplo). Selanjutnya data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel.

Penelitian dimulai dari sterilisasi alat dan bahan, pembuatan media, uji penegasan bakteri sampel dan bakteri uji, pembuatan supernatan bakteriosin, pembuatan suspensi bakteri uji, kemudian uji aktivitas supernatan bakteriosin terhadap *P. aeruginosa*.

Isolat *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* dan *L. casei* umur 2 hari dibuat suspensi dengan jumlah bakteri setara $1,5 \times 10^8$ CFU/mL kemudian sebanyak 500 μ L suspensi tersebut dikultur pada 10 mL MRS broth, diinkubasi pada suasana anaerob pada suhu $35 \pm 2^\circ$ C selama 48 jam. Hasil biakan tersebut diolah

dengan cara sentrifugasi 8000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan disaring menggunakan *millipore* \varnothing 0,22 μ m sehingga didapatkan supernatan yang bebas sel selanjutnya supernatan tersebut digunakan dalam uji aktivitas bakteriosin.

Suspensi bakteri uji ditanam pada media MHA dengan lidi kapas steril dan diberi label. Dibuat sumur pada masing-masing cawan dengan diameter \pm 5 mm, kemudian dimasukkan 50 μ L supernatan bakteriosin. Diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu $37\pm 2^\circ\text{C}$. Diamati adanya zona hambat yang terbentuk terhadap pertumbuhan *P.aeruginosa* di sekitar sumur yang telah ditambahkan supernatan bakteriosin.

Pada sumur 1 sebagai kontrol positif ditambahkan 200 μ L MHB, sedangkan pada sumur 2 berisi 100 μ L MHB dan 100 μ L suspensi bakteri uji sebagai kontrol negatif. Sebanyak 100 μ L MHB ditambahkan pada setiap sumur plat mikro. Pada sumur ketiga, ditambahkan 100 μ L supernatan bakteriosin kemudian dihomogenkan. Dari sumur ketiga diambil 100 μ L kemudian di pindahkan ke sumur keempat. Pengenceran terus dilakukan sampai sumur kedua belas yang akan memiliki konsentrasi terkecil. Kemudian 100 μ L suspensi bakteri (10^5 CFU/ml) ditambahkan pada semua sumur sehingga volume total tiap sumur sebanyak 200 μ L. Plat diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian diamati bagian yang jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba). Konsentrasi terkecil dimana tidak terlihat pertumbuhan mikroba ditetapkan sebagai KHM. Sebanyak 5 μ L alikuot dari setiap bagian yang jernih ditanam pada MHA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian diamati. Konsentrasi terkecil dimana tidak terlihat pertumbuhan mikroba ditetapkan sebagai KBM.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian dimulai dengan melakukan uji penegasan pada bakteri sampel dan bakteri uji kemudian dilakukan uji penelitian aktivitas bakteriosin *Lactobacillus sp* terhadap *P.aeruginosa* dengan menggunakan metode difusi agar dan metode mikrodilusi.

Supernatan bakteriosin *Lactobacillus sp* kemudian diuji aktivitas daya hambatnya terhadap *P.aeruginosa* dengan dua metode yaitu metode difusi agar menggunakan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan tiga kali pengulangan. Daya hambat ditandai dengan terbentuknya daerah bening (zona hambat) di sekitar sumur yang telah diisi dengan bakteriosin.

Tabel 1. Hasil Uji Aktivitas Supernatan Bakteriosin *Lactobacillus sp* terhadap *P. aeruginosa*

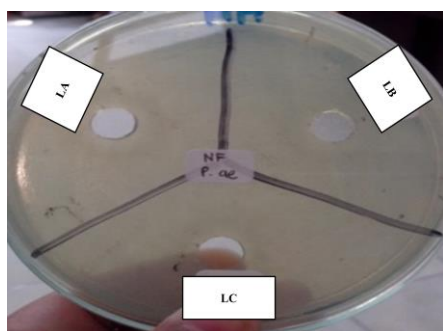
Sampel Uji	Diameter Zona Hambat (mm)
<i>L. acidophilus</i>	11,4 \pm 0,64
<i>L. bulgaricus</i>	11,4 \pm 0,62
<i>L. casei</i>	9,5 \pm 0,28
Siprofloksasin	21,05 \pm 0,21

Ket: Diameter sumur : 5mm

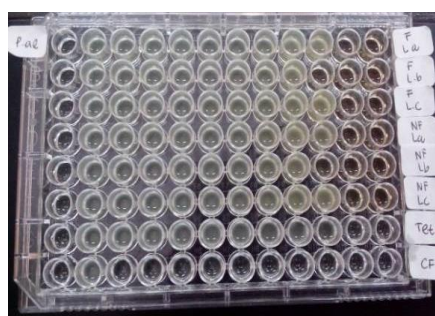
Pengujian aktivitas daya hambat dengan metode mikrodilusi menggunakan media *Mueller Hinton Broth* (MHB) dengan tiga kali pengulangan. Daya hambat ditandai dengan tidak terjadi pertumbuhan bakteri (jernih) pada konsentrasi terkecil yang merupakan nilai KHM kemudian 1 ose setiap bagian jernih ditanam pada MHA konsentrasi terkecil yang tidak terjadi pertumbuhan koloni bakteri adalah nilai KBM.

Tabel 2. Nilai KHM dan KBM Supernatan Bakteriosin *Lactobacillus sp* terhadap *P. aeruginosa*

Sampel Uji	KHM (%)	KBM (%)
<i>L. acidophilus</i>	6,25	12,5
<i>L. bulgaricus</i>	6,25	12,5
<i>L. casei</i>	6,25	25,0
Siprofloksasin	0,1	0,1



Gambar 1. Metode Difusi Agar



Gambar 2. Metode Mikrodilusi

Penelitian ini menggunakan tiga jenis BAL yaitu *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, dan *L. casei* sedangkan bakteri uji yang digunakan yaitu *P. aeruginosa*. Untuk memastikan bakteri tersebut benar maka terlebih dahulu dilakukan uji penegasan terhadap strain bakteri sampel maupun bakteri uji. Uji penegasan yang dilakukan meliputi pemeriksaan morfologi bakteri, penanaman pada media selektif dan pengujian sifat biokimia. Hasil uji penegasan menunjukkan bahwa spesies bakteri sampel adalah *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, dan *L. casei* dan spesies bakteri uji adalah *P. aeruginosa*.

Aktivitas terbesar dihasilkan oleh supernatan bakteriosin yang berasal dari *L. acidophilus* dan *L. bulgaricus* terhadap *P. aeruginosa* dengan diameter berturut-turut sebesar $11,4 \pm 0,64$ mm dan $11,4 \pm 0,62$ mm, sedangkan supernatan bakteriosin *L. casei* memiliki aktivitas lebih kecil yaitu sebesar $9,5 \pm 0,28$ mm.

Nilai KHM ketiga sampel supernatan bakteriosin sebesar 6,25%, kemudian nilai KBM supernatan bakteriosin *L. acidophilus* dan *L. bulgaricus* sebesar 12,5%, sedangkan *L. casei* dengan nilai KBM sebesar 25%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa supernatan bakteriosin *Lactobacillus sp* dapat menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa*. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Citra (2013) bahwa antibakteri dalam yoghurt yang berasal dari *L. bulgaricus* dapat menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa*. Diperkuat dengan hasil penelitian yang dilakukan Al-Mathkhury (2011) supernatan bakteriosin yang dihasilkan *L. acidophilus* mampu menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa*.

Supernatan bakteriosin *L. acidophilus* dan *L. bulgaricus* memiliki aktivitas lebih tinggi dibanding dengan supernatan bakteriosin *L. casei* dalam menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa*. Supernatan bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. acidophilus* dan *L. bulgaricus* memiliki ketahanan metabolit tidak hanya pada pH asam tetapi pada pH basa sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji lebih baik. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Dhewa (2012) bahwa supernatan bakteriosin yang berasal dari *Lactobacillus sp* memiliki aktivitas penghambatan pada kisaran pH 4-7 tetapi aktivitasnya menurun atau tidak aktif setelah terpapar pH diatas 8.

Daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri disebabkan karena supernatan bakteriosin yang dihasilkan *Lactobacillus sp* mampu mengganggu permeabilitas *P. aeruginosa* dengan merusak membran sel, kemudian menembus sitoplasma sehingga sel menjadi lisis. Permeabilitas membran bakteri uji dilindungi oleh lapisan lipopolisakarida yang terletak pada permukaan sel yang kemudian dirusak oleh asam organik sehingga supernatan bakteriosin dapat masuk ke dalam membran sitoplasma sehingga menyebabkan sel *P. aeruginosa* mati.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa bakteriosin *Lactobacillus sp* memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* dengan aktivitas paling tinggi ditunjukkan oleh bakteriosin *L. acidophilus* dan *L. bulgaricus*.

Untuk penelitian selanjutnya disarankan menggunakan bakteriosin tunggal atau kombinasi kemudian diuji aktivitasnya terhadap bakteri patogen lain, kemudian perlu dilakukan pemisahan metabolit dari BAL yang berperan lebih spesifik dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Bahan Pangan. Mikrobiologi Pangan. Sidoarjo Jawa Timur. [Online]:<http://miuwbangget.blogspot.com/2011/04/bakteriosin-sebagai-biopreservatif.html>. Diunduh 31 Januari 2014 10:15

5. REFERENSI

1. Sulistyaningsih. 2010. Uji Kepekaan Beberapa Sediaan Antiseptik terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Pseudomonas aeruginosa* Multi Resisten (PAMR). Jatinangor :Universitas Padjadjaran.
2. Natalia, Lia. 2008. *Pseudomonas aeruginosa*, penyebab infeksi nosokomial. Tersedia [Online]:<http://mikrobia.files.wordpress.com/2008/05/lia-natalia078114123.pdf>. Diunduh 31 Januari 2014 10:15
3. Fanniyah, dkk. 2011. Uji Efektivitas Ekstrak Kulit Buah Klerak (*Sapindus rarak*) sebagai Antimikroba terhadap *Pseudomonas aeruginosa* secara In Vitro. Malang : Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. [Online]:<http://old.fk.uib.ac.id/artikel/id/filedownload/kedokteran/Fanniyah.pdf>. Diunduh 29 Januari 2014 19:45
4. Kusumawati, Netty. 2000. Peranan Bakteri Asam Laktat dalam Menghambat *Listeria monocytogenes* pada Bahan Pangan. Surabaya : Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya. [Online]:<http://journal.wima.ac.id/index.php/JTPG/article/view/77/76>. Diunduh 30 Januari 2014 08:30
5. Usmiati, Sri dkk. 2009. Pengaruh Penggunaan Bakteriosin dari *Lactobacillus sp* Galur SCG 1223 terhadap Kualitas Mikrobiologi Daging Sapi Segar. Bogor : Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen dan Institut Pertanian Bogor. [Online]:<http://peternakan.litbang.deptan.go.id/fullteks/jitv/jitv142-9.pdf>. Diunduh 31 Januari 2014 09:17
6. Wahyuni, Miwing Nurul. 2011. Bakteriosin sebagai Biopreservatif dalam

LAMPIRAN

Data Hasil Penelitian

Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Bakteriosin *Lactobacillus sp* Terhadap Pertumbuhan *P.aeruginosa* Metode Difusi

No	Jenis Bakteriosin	Diameter Zona Hambat (mm)		
		I	II	III
1	<i>L.acidophilus</i>	11,0	12,1	11,0
2	<i>L.bulgaricus</i>	11,2	10,9	12,1
3	<i>L.casei</i>	9,7	9,2	9,7
4	Siprofloksasin	21,2	20,9	-

Keterangan : Diameter sumur : 5 mm

L.acidophilus : konsentrasi 100%
L.bulgaricus : konsentrasi 100%
L.casei : konsentrasi 100%
Siprofloksasin : konsentrasi 100 µg/ml

Hasil Pengamatan Daya Hambat Bakteriosin (KHM) terhadap Pertumbuhan *P.aeruginosa* Metode Mikrodilusi

No	Sampel Uji	Pengujian	Pengenceran												KBM (%)
			KHM (%)												
			K+	K-	50%	25%	12,5%	6,25%	3,2%	1,56%	0,78%	0,39%	0,19%	0,1%	
1	<i>L.acidophilus</i>	1	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	12,5%
		2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
		3	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
2	<i>L.bulgaricus</i>	1	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	12,5%
		2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
		3	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
3	<i>L.casei</i>	1	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	25%
		2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
		3	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
4	Siprofloksasin	1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,1 %
		2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Keterangan : (+) = Ada penghambatan terhadap bakteri uji
 (-) = Tidak ada penghambatan terhadap bakteri uji
 Nilai KHM dan KBM antibiotik dinyatakan dalam gr/100mL (%)