

Uji Kepekaan *Bacillus subtilis* yang Diisolasi dari Sedimen Tambak Udang dan Tambak Ikan terhadap Bahan Antimikroba

Antibacterial Susceptibility of *Bacillus subtilis* Isolated From Shrimp Pond and Fish Pond Sediment

¹Erni Rosilawati Sabar Iman, ²Isa Mahendra, ¹R. Budi Utomo

¹ Fakultas Kedokteran Hewan Unair

² PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : ernirosi@yahoo.co.id

Abstract

The aim of this research was to know the characters of *Bacillus subtilis* isolated from shrimp pond and fish pond sediment, their susceptibility to antibacterial agents and whether there were any difference of susceptibility between both samples. Six isolates of both samples have characteristics like rod shaped, Gram positive, unchained, glucose and sucrose fermented positive, release catalase enzyme, unreleased urease enzyme, H₂S negative, didn't produce indole, motile, and hydrolyze starch. The result of antibacterial susceptibility test showed that *Bacillus subtilis* susceptible to *Penicillin*, *Ampicillin*, *Gentamicin*, *Ciprofloxacin*, *Oxytetracyclin* and *Sulfamethoxazole*. There were no significant difference among of antimicrobial agents except Gentamicin. The wide range of sensitivity indicate that *Bacillus subtilis* safe and can be considered as candidate of probiotics.

Keywords : *Bacillus subtilis*, antibacterial susceptibility, probiotic

Pendahuluan

Budidaya ikan, udang, merupakan salah satu sektor yang memproduksi makanan dengan pertumbuhan tercepat. (Adam, 2000). Penyakit bakteri merupakan penyebab utama kematian dari udang maupun ikan sehingga menimbulkan kerugian yang signifikan bagi industri perikanan. (Albanjari, 2009). Munculnya bakteri yang resisten terhadap penggunaan antibiotika telah mengintensifkan pencarian alternatif pengganti antibiotika (Bedford, 2000).

Penggunaan probiotik menjadi metode yang dikembangkan untuk melawan penyebab penyakit selama satu dekade terakhir. Keamanan dari probiotik ditentukan melalui suatu uji, salah satunya uji kepekaan terhadap bahan antimikroba (FAO/WHO, 2002). Menurut Sreekumar dan Krishnan (2010), rentang diameter zona hambat yang besar terhadap bahan antimikroba yang umum digunakan akan menjadikan suatu produk probiotik yang sangat aman.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Awais *et al.* (2007), pada sedimen tambak udang terdapat berbagai macam spesies dari bakteri *Bacillus* diantaranya spesies *Bacillus subtilis*. *Bacillus subtilis* merupakan bakteri *Bacillus* yang tidak patogen. *Bacillus subtilis* sering digunakan sebagai bahan probiotik untuk membantu menyeimbangkan bakteri yang menyehatkan di dalam saluran pencernaan.

Mempertimbangkan hal-hal tersebut diatas, maka dilakukan penelitian tentang uji kepekaan *Bacillus subtilis* terhadap bahan antimikroba sebagai salah satu syarat menentukan keamanan dari probiotik. *Bacillus subtilis* diperoleh dengan cara melakukan isolasi dan identifikasi dari dua jenis sedimen yang diambil dari tambak udang dan ikan di Kecamatan Bungah, Kabupaten Gresik, Provinsi Jawa Timur. Antimikroba yang digunakan adalah antimikroba jenis *Penicillin*, *Aminoglycoside*, *Tetracycline*, *Quinolone*.

Penulis menggunakan dua jenis tambak yang berbeda bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan kepekaan pada *Bacillus subtilis* yang diisolasi masing-masing jenis tambak terhadap pemberian bahan antimikroba dengan cara membandingkan menggunakan analisis statistik *t test*.

Materi dan Metode Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga mulai bulan Februari hingga Juni 2011.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, inkubator, timbangan, botol sampel, spuit, labu erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, ose bulat, ose lancip, termo meter, pembakar bunsen, *object glass*, mikroskop, mistar, pinset.

Sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini berupa sedimen tambak udang dan sedimen tambak ikan yang diambil dari tambak udang dan tambak ikan di Kecamatan Bungah Kabupaten Gresik Provinsi Jawa Timur.

Bahan yang digunakan adalah aquades steril, media *mannitol salt agar* (MSA), media *muller hinton agar* (MHA), *nutrient broth* (NB), disk antibiotika terdiri atas *Penicillin G*, *Ampicillin*, *Gentamicin*, *Oxytetracycline*, *Ciprofloxacin*, *Sulfamethoxazole*, gentian violet, lugol, alkohol aceton, safranin; media *sulfide indol motility* (SIM), media *simmons citrate agar* (SCA), media *voges-proskauer test* (VP); media *starch agar*, H_2O_2 , media *urease agar*, media glukosa, media sukrosa.

Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari sedimen tambak udang dan tambak ikan Kecamatan Bungah Kabupaten Gresik. Pengambilan dilakukan dengan cara mengambil sedimen pada bagian dasar tambak sebanyak yang dibutuhkan, dengan pertimbangan bahwa dibagian dasar tambak mengandung *Bacillus subtilis* yang berasal dari tanah dan feses ikan maupun udang kemudian dimasukkan ke dalam botol sampel yang sebelumnya telah disterilkan.

Isolasi dan Identifikasi *Bacillus subtilis*

Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* menggunakan teknik *dillution and spread plate technique* (Katz, 2008). Identifikasi spesies bakteri dilakukan menurut manual Bergey tentang bakteriologi dikombinasikan dengan data dari karakter strain *Bacillus* oleh Sistem API yang dijelaskan oleh Logan dan Berkeley (1984).

Sampel dipanaskan pada suhu 80°C selama 20 menit. Pemanasan berfungsi untuk membunuh bakteri yang tidak berspora. Masing-masing sampel sebanyak 0,5 g dilarutkan 4,5 ml aquades steril kemudian diencerkan hingga pengenceran 10^7 dan ditanam pada media MSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (Aslim *et al.*, 2000; Purivirojkul *et al.*, 2005).

Setelah 2 hari, dilihat hasil pertumbuhan dari koloni bakteri yang tumbuh. Bakteri yang memfermentasi *mannitol* ditunjukkan dengan perubahan warna media menjadi kuning. Kemudian dilakukan identifikasi secara mikroskopik dengan melakukan pewarnaan Gram pada bakteri yang memfermentasi *mannitol*. Bakteri *B.subtilis* berbentuk batang, bersifat Gram positif, dan tidak berantai (Logan and berkeley.1984). Selanjutnya dilakukan uji biokimia dan gula-gula yang meliputi uji *sulfide indol motility* (SIM), uji *simmons citrate agar* (SCA), uji *voges-proskauer* (VP); uji *starch*, uji katalase, uji urease, uji glukosa, uji sukrosa.

Uji Kepekaan Antibiotika

Uji kepekaan antibiotika dilakukan dengan teknik difusi Kirby Bauer. Suspensi bakteri diambil dengan cara *cotton bud* steril dicelupkan pada tabung yang berisikan suspensi bakteri yang sudah distandarkan dengan *McFarland* 0,5. Kemudian dilakukan *swab* secara merata pada media MHA, lalu biarkan selama 5-10 menit agar bakteri menempel pada permukaan media. Masing-masing disk antibiotika kemudian diletakkan pada cawan petri berisi media MHA yang telah diinokulasikan dengan *B.subtilis*.

Disk antibiotika diletakkan dengan sedikit ditekan pada permukaan media dengan bantuan pipet steril dan usahakan jarak antara antibiotika cukup lebar supaya tidak terjadi penumpukan hasil. Langkah selanjutnya diamkan media selama 15 menit supaya antibiotika dapat berdifusi ke dalam media sebelum pertumbuhan bakteri

berlangsung secara optimal kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Bailey and Scott, 2002).

Hasil pengujian difusi disk terlihat adanya zona bening atau jernih disekitar disk antibiotika sebagai daerah hambatan pertumbuhan bakteri. Daerah hambatan kemudian diukur menggunakan mistar. Besarnya diameter daerah hambatan digunakan untuk menentukan kepekaan bakteri terhadap antibiotika yang dikelompokkan menjadi dua kategori yaitu peka atau sensitif dan tidak peka atau resisten berdasarkan standard yang dijelaskan oleh Adewumi *et al* (2009).

Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan *t Test* untuk mengetahui adanya perbedaan nyata atau tidak nyata dari hasil uji kepekaan bakteri pada masing-masing jenis tanah terhadap jenis bahan antimikroba.

Hasil dan Pembahasan

Setelah melakukan isolasi pada sedimen tambak udang dan tambak ikan yang berasal dari Kecamatan Bungah Kabupaten Gresik yang masing-masing terdiri atas 3 sampel, didapatkan 6 koloni bakteri *Bacillus subtilis* dari sedimen tambak udang dan 6 koloni dari sedimen tambak ikan. Gambar koloni *Bacillus subtilis* dapat dilihat pada gambar.1. Karakteristik *Bacillus subtilis* yang teridentifikasi dapat dilihat pada Tabel. 1. Hasil uji kepekaan terhadap bahan antimikroba dapat dilihat pada Tabel.2.

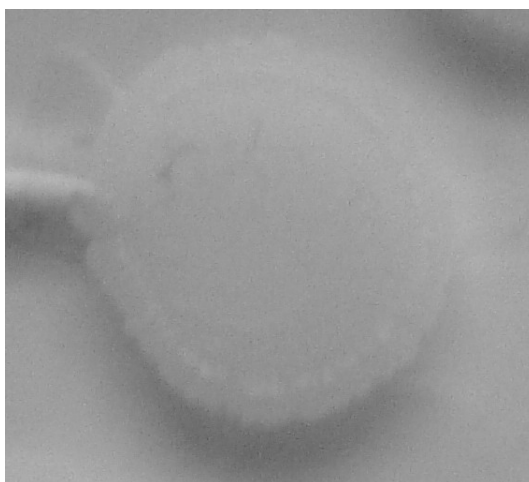
Analisis statistik menggunakan uji t dengan tingkat

kepercayaan 95% yang ditunjukkan pada tabel. 3 dapat diketahui adanya perbedaan tidak nyata pada semua isolat *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari sedimen tambak udang dan ikan terhadap masing-masing jenis bahan antimikroba, kecuali *gentamicin*.

Hasil analisis statistik menggunakan uji t menunjukkan adanya perbedaan nyata pada kepekaan gentamicin terhadap *Bacillus subtilis* pada masing-masing jenis tanah. Adanya perbedaan kepekaan mulai menunjukkan terjadinya mekanisme resistensi dari *Bacillus subtilis* terhadap *Gentamicin* yang merupakan jenis *Aminoglycoside*. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh adanya transfer gen dari bakteri lain yang terdapat pada tambak ikan maupun udang yang pernah terpapar oleh pemberian antibiotika *Aminoglycoside*.

Bakteri dapat resisten terhadap *Aminoglycoside* karena kegagalan penetrasi ke dalam bakteri, rendahnya afinitas obat pada ribosom atau inaktivasi obat oleh enzim bakteri antara lain enzim *acetyltransferases*, *phosphotransferases*, dan *adenylyltransferases*. Informasi genetik untuk sintesis enzim terutama didapat melalui konjugasi, transfer DNA sebagai plasmid dan transfer faktor resisten. Plasmid pembawa faktor resistensi yang tersebar luas dan membawa lebih dari 20 kode enzim yang bertanggung jawab terhadap penyempitan spektrum gentamicin (Ganiswarna, 1995).

Sintesis protein melibatkan sejumlah komponen yaitu ribosom, tRNA, mRNA, protein tambahan, dan molekul kecil lainnya. Ketika



Gambar 1. Koloni *Bacillus subtilis*

Tabel 1. Karakteristik isolat positif *Bacillus subtilis*

<i>Bacillus subtilis</i>		Fermentasi	Mikroskopis			Uji Biokimia								Uji Gula-Gula	
		Mannitol	Gram	Bentuk Batang	Rantai	Katalase	H ₂ S	Indol	Motility	VP	Sitrat	Urease	Starch	Glukosa	Sukrosa
Tambak udang	TU 4	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
	TU 21	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
	TU 28	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
	TU 34	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
	TU 43	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
	TU 48	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Tambak ikan	TI1D7	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
	TI2S3	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
	TI2S8	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
	TI2D2	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
	TI3D4	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
	TI3D6	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+

Tabel 2. Diameter zona hambat bahan antimikroba terhadap *Bacillus subtilis* dinyatakan dalam satuan millimeter (mm)

<i>Bacillus subtilis</i>		Bahan Antimikroba					
		Penicillin	Ampicillin	Oxytetracycline	Gentamicin	Ciprofloxacin	Sulfamethoxazole
Tambak Udang	TU 4	25 (S ^{**})	24 (S ^{**})	31 (S ^{***})	22 (S ^{**})	31 (S ^{***})	31 (S ^{***})
	TU 21	32 (S ^{***})	32 (S ^{***})	16 (S [*])	38 (S ^{***})	38 (S ^{***})	34 (S ^{***})
	TU 28	23 (S ^{**})	31 (S ^{***})	17 (S ^{**})	34 (S ^{***})	34 (S ^{***})	33 (S ^{***})
	TU 34	31 (S ^{***})	29 (S ^{***})	26 (S ^{***})	33 (S ^{***})	33 (S ^{***})	30 (S ^{***})
	TU 43	31 (S ^{***})	33 (S ^{***})	19 (S ^{**})	30 (S ^{***})	30 (S ^{***})	31 (S ^{***})
	TU 48	29 (S ^{***})	28 (S ^{***})	17 (S ^{**})	31 (S ^{***})	31 (S ^{***})	31 (S ^{***})
	Σ	171	177	126	188	197	190
	χ	28.5	29.5	21	31.3	32.83	31.667
Tambak ikan	TI1D7	31 (S ^{***})	29 (S ^{***})	19 (S ^{**})	23 (S ^{**})	30 (S ^{***})	31 (S ^{***})
	TI2S3	31 (S ^{***})	58 (S ^{***})	19 (S ^{**})	22 (S ^{**})	30 (S ^{***})	30 (S ^{***})
	TI2S8	15 (S [*])	20 (S ^{**})	17 (S ^{**})	29 (S ^{***})	37 (S ^{***})	32 (S ^{***})
	TI2D2	30 (S ^{***})	28 (S ^{**})	31 (S ^{***})	23 (S ^{**})	34 (S ^{***})	31 (S ^{***})
	TI3D4	35 (S ^{***})	38 (S ^{***})	32 (S ^{***})	24 (S ^{**})	36 (S ^{***})	32 (S ^{***})
	TI3D6	18 (S ^{**})	22 (S ^{**})	33 (S ^{***})	22 (S ^{**})	30 (S ^{***})	28 (S ^{***})
	Σ	160	195	151	143	197	184
	χ	26.67	32.5	25.167	23.83	32.83	30.667

Keterangan : 0-5 mm = Resisten (R); 6-15 mm = Sensitif (S^{*}); 16-25 mm = Sensitif (S^{**}); >26mm = Sensitif (S^{***}). (Adewumi *et al.*, 2009)

Tabel 3. Analisis statistik menggunakan *t Test* uji kepekaan *Bacillus subtilis* pada masing-masing jenis tanah terhadap jenis bahan antimikroba

Bahan Antimikroba	Standard Error	T hitung	T tabel ($\alpha=0,05$)	Analisis
Penicillin	3,63	0,5033	2,228	Tidak berbeda nyata
Ampicillin	5,86	5,86	2,228	Tidak berbeda nyata
Oxytetracycline	3,96	1,05	2,228	Tidak berbeda nyata
Gentamicin	2,43	2,43	2,228	Berbeda nyata
Ciprofloxacin	1,95	0	2,228	Tidak berbeda nyata
Sulfamethoxazole	0,86	1,15	2,228	Tidak berbeda nyata

sintesis protein dihambat oleh antibiotika, target utamanya adalah ribosom. Ribosom bakteri terdiri dari dua subunit riboprotein antara lain subunit 30S dan subunit 50S. Resistensi terhadap antibiotika yang menghambat sintesis protein dimediasi oleh determinan R. *Aminoglycoside* mengikat subunit 30S dan mencegah transisi dari kompleks dimulai ke kompleks elongasi selain itu aminoglikosida juga mengganggu proses decoding. Subunit 30S terdiri dari 21 protein ribosom (rprotein) dan molekul ribosom dengan RNA 16S (rRNA). Mutasi mengarah adanya perubahan resistensi dari rprotein S12 atau 16S rRNA sehingga ribosom mengurangi afinitas untuk antibiotika. Kebanyakan bakteri yang tumbuh cepat memiliki beberapa salinan gen rRNA yang merupakan genetik resesif untuk sensitivitas antibiotika yang menyebabkan adanya resistensi (Finken *et al.*, 1993). Adanya jenis enzim antara lain *acetyltransferases*, *phosphotransferases*, dan *adenylyltransferases* diketahui bertanggung jawab atas resistensi terhadap aminoglikosida (Shaw *et al.*, 1993).

Konjugasi merupakan pemindahan gen resisten dari satu sel ke sel lain. Beberapa bakteri spesies tertentu mempunyai *sex* faktor F^+ sementara yang lain mempunyai *sex* faktor F^- pada plasmidnya. Bakteri Gram positif mempunyai molekul permukaan lengket yang dihasilkan untuk bakteri melakukan kontak dengan bakteri lain. Bakteri donor memproduksi *adhesins* yang mengakibatkan bakteri beragregasi dengan bakteri resipien sehingga DNA dari donor ditransferkan kepada resipien. *Plasmid-mediated conjugation* terjadi pada *Bacillus subtilis* (Rau, 2012).

Kesimpulan

1. Seluruh isolat *Bacillus subtilis* yang telah diisolasi bersifat sensitif terhadap *Penicillin*,

Ampicillin, *Oxytetracycline*, *Gentamicin*, *Ciprofloxacin*, dan *Sulfamethoxazole*.

2. Terdapat perbedaan kepekaan *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari tambak udang dan tambak ikan terhadap pemberian *Gentamicin*.

Daftar Pustaka

- Adam A.K.K.P. 2000. Industri dan Ekspor Udang Indonesia. Fakultas Ekonomi Universitas Indonesia.
- Adewumi G.A., R.A.Quadri, and F.A.Oguntoyinbo.2009. Antibiotic Sensitivity Pattern of *Bacillus* Species Isolated from Solid Substrate Fermentation of Cassava for Gari Production. African Journal of Microbiology Research Vol (3).11.
- Albanjari T. 2009. Penanggulangan Penyakit Ikan Air Tawar dengan Bahan Alami di Sekitar Lingkungan Kita.
- Aslim B., N. Saglam and Y. Beyatli. 2002. Determination of Some Properties of *Bacillus* Isolated from Soil. Turkish Journal of Biology.41-48.
- Awais, M., Aamer Ali Shah, Abdul Hameed and Fariha Hasan. 2007. Isolation, Identification and Optimization of Bacitracin Produced by *Bacillus* sp. Department of Microbiology Faculty of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan. Pak. J. Bot., 39(4): 1303-1312.
- Bailey and Scott. 2002. Diagnostic Microbiology. 11th edition. The C.V. Mosby Company. St, Louis. United States of America. 232.240.
- Bedford, M. 2000. Removal of antibiotika growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimize subsequent

- problems. World Poult. Sci. J. 56: 347-365.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada.
- Finken, M., Kirschner, P., Meier, A., Wrede, A., and Böttger, E. C. (1993). Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol. Microbiol.* 9, 1239–1246.
- Ganiswarna GS. 1995. Farmakologi dan Terapi. Jakarta. Gaya Baru,: 863.
- Katz, D.S. 2008. The Streak Plate Protocol, Rogers State University. Claremore. United States of America.
- Logan N.A., R.C.W. Berkeley. 1984. Identification of *Bacillus* Strains Using API System. Department of Microbiology. The Medical School, University of Bristol. *Journal of General Microbiology.* 130: 1871-1882.
- Purivirojkul, W., M. Maketon and N. Areechon. 2005. Probiotic Properties of *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis* in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) Culture. Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
- Rau, S.P.N. 2012. Bacterial Genetics. Dept. of Microbiology JJMMC, Davangere.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., and Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of Aminoglikosida resistance genes and familial relationships of the Aminoglikosida-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57, 138–163.
- Sreekumar, G., and S. Krishnan. 2010. Isolation and Screening of Brittle Star Associated Bacteria of Antibacterial Activity. *Current Microbiology.* 44:450-459.