



Bakteri heterotrof aerobik asal saluran pencernaan ikan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) dan potensinya sebagai probiotik

NATALIA WIDYA LESTARI, AGUNG BUDIHARJO, ARTINI PANGASTUTI ♥

♥Alamatkorespondensi:

Jurusan Biologi, Fakultas
Matematikadan Ilmu
PengetahuanAlam, Universitas
Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami36a
Surakarta 57126, Jawa Tengah,
Indonesia. Tel./Fax.: +92-271-
663375. ♥email: artini_p@staff.uns.ac.id

Manuskripditerima: 24 Januari 2016.
Revisidisetujui: 4 Maret 2016.

Lestari NW, Budiharjo A, Pangastuti A. 2016. Aerobic heterotrophic bacteria from the digestive tract of eel (*Anguilla bicolor bicolor*) and its potential as probiotics. *Bioteknologi* 13: 9-17. *Anguilla bicolor bicolor*, an eel species found in the waters of Indonesia, is become a potential export commodity for the country. Currently this species began to be cultured, by taking the larvas from the wild and reared in ponds. In aquaculture, the disease caused by bacteria are the main problems that limit production in the culture of eel. Restrictions on the use of anti-microbial substances causing a more environmentally friendly approach is needed to reduce disease outbreak in aquaculture. It is known that bacterial communities associated with animals have an important role for the survival of its modulation of host's microbiota through feed supplements such as probiotics and prebiotics can increase the growth and survival of fish. This research aimed to determine the type of bacteria that can be isolated and characterized from the gastrointestinal tract of *A. bicolor bicolor* and their potential as a probiotic candidates. Bacteria from the gastrointestinal tract of the fish were isolated and characterized. Observations made include the amount of bacteria in the gastrointestinal tract, the morphological characters of each isolate, and the identification of each isolate. The ability of hydrolysis (hemolytic and proteolytic activity) and antagonistic against pathogens in fish (*Aeromonas hydrophila*) were also measured. From the gastrointestinal tract of *A. bicolor bicolor*, 11 isolates were obtained, which were fell into 9 species according to their characters. Two candidates of bacteria which were expected to be used as probiotics for eel were *Citrobacter freundii* and *Bacillus subtilis*.

Keywords: *Anguilla bicolor bicolor*, probiotic, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis*

Lestari NW, Budiharjo A, Pangastuti A. 2016. Bakteri heterotrof aerobik asal saluran pencernaan ikan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) dan potensinya sebagai probiotik. *Bioteknologi* 13: 9-17. *Anguilla bicolor bicolor*, salah satu spesies ikan sidat yang ditemukan di perairan Indonesia, adalah komoditas ekspor potensial bagi Negara ini. Saat ini spesies tersebut mulai dikulturkan, dengan mengambil benih dari alam dan dibesarkan dalam kolam-kolam pemeliharaan. Dalam akuakultur, penyakit yang disebabkan oleh bakteri merupakan masalah utama yang membatasi produksi di pemeliharaan ikan sidat. Pembatasan penggunaan bahan anti mikroba membuat pendekatan yang lebih ramah lingkungan perlu dilakukan untuk mengurangi berjangkitnya penyakit di kolam pemeliharaan. Telah diketahui bahwa komunitas bakteri yang berasosiasi dengan hewan memiliki peran penting bagi kelangsungan hidup inangnya. Pemberian suplemen pakan seperti probiotik dan prebiotik untuk memodulasi komunitas mikroba yang berasosiasi dengan ikan dapat meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan. Penelitian bertujuan mengetahui jenis bakteri yang dapat diisolasi dan dikarakterisasi dari saluran pencernaan *A. bicolor bicolor* dan potensi bakteri sebagai kandidat probiotik. Saluran pencernaan yakni usus dan lambung diisolasi dan dikarakterisasi jenis bakteri yang didapat. Pengamatan yang dilakukan meliputi jumlah bakteri pada media kultur, karakter morfologi masing-masing isolat, dan identifikasi dari masing-masing isolat. Dari saluran pencernaan ikan sidat *A. bicolor bicolor* diperoleh 11 isolat bakteri yang berdasarkan hasil identifikasi terdiri dari 9 spesies. Dilakukan uji kemampuan hidrolitik (hemolitik dan proteolitik) dan antagonistik terhadap bakteri patogen pada ikan (*Aeromonas hydrophila*) sehingga diperoleh 2 kandidat bakteri yang diperkirakan dapat digunakan sebagai probiotik ikan sidat, yaitu *Citrobacter freundii* dan *Bacillus subtilis*.

Kata kunci: *Anguilla bicolor bicolor*, probiotik, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis*

PENDAHULUAN

Anguilla bicolor bicolor merupakan salah satu spesies ikan sidat yang hidup di perairan Indonesia. Permintaan akan komoditas ikan sidat ini semakin meningkat terutama dari pasar Jepang. Dalam rangka peningkatan produksi untuk memenuhi permintaan ekspor, ikan sidat mulai dibudidayakan, walaupun masih terbatas untuk pembesaran saja sampai mencapai ukuran yang siap dikonsumsi. Permintaan pasar yang tinggi memberikan peluang yang sangat terbuka untuk membudidayakan ikan ini.

Salah satu masalah yang dapat menghambat produksi ikan sidat adalah penurunan produksi akibat penyakit yang berkembang di kolam-kolam pemeliharaan. Dalam akuakultur, penggunaan pakan yang berlebih serta padat tebar yang tinggi menyebabkan lingkungan air pemeliharaan menjadi medium yang baik untuk pertumbuhan bakteri heterotrofik atau oportunistik (Chinabut dan Puttinaowarat 2005). Sebagian besar penyakit pada ikan disebabkan oleh bakteri oportunistik. Penggunaan senyawa kimia seperti desinfektan dan antibiotik tidak terlalu efektif untuk pencegahan maupun pengobatan penyakit ikan (Olafsen 2001). Selain itu, adanya residu antibiotik menyebabkan produk akuakultur tidak memenuhi standar beberapa negara yang menjadi tujuan ekspor. Penggunaan senyawa antimikroba secara berlebihan juga menseleksi strain resisten kemudian bakteri dapat mempertukarkan gen penyandi resistensinya, bahkan antarbakteri yang kekerabatannya cukup jauh. Dari reservoir lingkungan perairan, gen penyandi resistensi dapat menyebar kepada patogen manusia dan kemudian mencapai manusia (Heuer et al. 2009).

Komunitas bakteri (mikrobiota) pada hewan akuatik diduga memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan dan kemampuan bertahan hidup inang. Mikrobiota dapat mempengaruhi sejumlah besar ekspresi gen pada inangnya, terutama gen yang berperan dalam imunitas dan nutrisi (Nayak 2010). Bakteri dapat membantu nutrisi inang dengan produksi enzim atau senyawa esensial (Verschuere et al. 2000) dan dapat mencegah bakteri patogen oportunistik untuk berproliferasi dan mengkolonisasi tubuh inang, terutama pada tahap larva di mana sistem imunitas belum berkembang sempurna (Hansen dan Olafsen 1999). Berbeda dengan hewan terestrial, hewan akuatik berbagi ekosistem yang

sama dengan komunitas bakteri yang berasosiasi dengannya, sehingga komunitas bakteri selalu berubah secara dinamis mengikuti komunitas bakteri di lingkungannya (Cahill 1990). Hal ini memberikan peluang untuk melakukan introduksi bakteri yang menguntungkan ke dalam komunitas bakteri yang telah terbentuk pada inang. Dengan demikian, modulasi komunitas mikroorganisme yang berasosiasi dengan ikan merupakan salah satu cara untuk mencegah penyakit dan meningkatkan produksi secara lebih aman. Yang perlu diperhatikan di sini adalah bakteri dominan pada usus ikan berbeda dengan yang diamati pada mamalia. Bakteri-bakteri ini bersifat oportunistik dan keberadaannya bersifat transitori tergantung kondisi lingkungan. Asosiasi antara mikroba dan inangnya tidak bertahan sepanjang hidupnya. Pada ikan, terdapat variabilitas bakteri intestinal yang dominan antarpeternakan atau *hatchery*. Hal ini mengindikasikan perlunya untuk mengembangkan probiotik dan prebiotik di tiap lokasi berbeda secara unik (Gatesoupe 2005).

Salah satu alternatif pendekatan yang telah sukses dilakukan pada akuakultur adalah dengan mengintroduksi kultur hidup bakteri yang telah diketahui memiliki efek menguntungkan bagi pertumbuhan hewan akuatik, yang dikenal dengan probiotik. Sementara itu, modulasi komunitas bakteri yang berasosiasi dengan ikan juga dapat dilakukan dengan memberikan substrat yang dapat menguntungkan pertumbuhan bakteri-bakteri baik dalam saluran pencernaan, yang dikenal sebagai prebiotik. Akan tetapi, perlakuan prebiotik membutuhkan keberadaan mikroba yang menguntungkan pada mikrobiota ikan. Beberapa penulis (Verschuere et al. 2000; Irianto dan Austin 2002; Burr dan Gaitlin 2005; Gatesoupe 2005; Vine et al. 2006; Yousefian 2009) mengulas perkembangan dalam penggunaan probiotik dan prebiotik untuk hewan kultur akuatik.

Sampai saat ini, penelitian tentang biologi *A. bicolor bicolor* belum banyak dilakukan. Informasi tentang komunitas mikroorganisme yang ada di saluran pencernaan *A. bicolor bicolor* juga belum pernah dilaporkan sebelumnya. Untuk itu dilakukan penelitian ini, yang bertujuan mengetahui jenis dan karakteristik bakteri yang berasosiasi dengan saluran pencernaan *A. bicolor bicolor* dan potensinya sebagai kandidat probiotik.

BAHAN DAN METODE

Sampling *A. bicolor bicolor*

Ikan sidat *A. bicolor bicolor* dikoleksi dari Karangpandan, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Dari ikan yang sehat diambil 10 ikan sebagai sampel. Masing-masing ikan diambil saluran pencernaannya meliputi lambung dan usus, kemudian disterilisasi dengan menggunakan formalin. Saluran pencernaan dicuci dengan garam fisiologis (0,85% NaCl) steril untuk menghilangkan bakteri yang tidak menempel pada saluran pencernaan, dikeringanginkan, dan selanjutnya diisolasi bakterinya.

Kultur dan penghitungan jumlah bakteri

Sampel saluran pencernaan ikan dihomogenisasi dalam 0,85% NaCl steril kemudian dibuat pengenceran berseri 10-1-10-6. Sebanyak 0,1 mL seri pengenceran 10-3-10-6 disebar pada medium TSA (Oxoid) dengan menggunakan metode cawan sebar dan dilakukan tiga kali sebagai ulangan. Hasil kultur kemudian diinkubasi di suhu 28°C selama 1x24 jam. Pengamatan koloni bakteri yang dilakukan berupa penghitungan jumlah koloni bakteri total tiap cawan dan jumlah masing-masing jenis bakteri yang berbeda menurut penampakan morfologi koloni bakteri. Penghitungan jumlah bakteri menggunakan metode TPC (*total plate count*) dimana cawan yang menghasilkan jumlah koloni 30-300 buah dipilih dan dihitung. Jumlah bakteri dinyatakan sebagai CFU (*colony forming unit*). Koloni dengan penampakan morfologi berbeda kemudian diambil dan dimurnikan pada media baru menggunakan metode cawan gores. Masing-masing isolat disimpan dalam media agar miring pada suhu 4°C dan dalam 15% gliserol pada -20°C untuk penyimpanan.

Identifikasi jenis bakteri

Isolat bakteri murni diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi yang meliputi morfologi koloni, morfologi sel, dan uji pewarnaan gram. Pengamatan morfologi koloni dilihat dari bentuk, warna dan tepian koloni bakteri. Pengamatan morfologi sel meliputi bentuk sel dan pengaturan/susunan sel. Selanjutnya masing-masing isolat dikarakterisasi secara biokimia yang meliputi uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa, manitol, maltosa, dan sukrosa), sulfur, indol, motilitas, dan sitrat.

Uji fermentasi karbohidrat

Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam tabung-tabung reaksi yang berisi medium fermentasi glukosa, laktosa, manitol, maltosa, dan sukrosa, lalu diinkubasikan dalam suhu kamar selama 18-24 jam. Uji fermentasi karbohidrat positif, jika warna merah medium fermentasi karbohidrat berubah menjadi kuning, berarti bakteri tersebut memfermentasi gula dan menghasilkan asam. Apabila dalam tabung Durham terdapat gelembung, berarti fermentasi tersebut juga menghasilkan gas (CO₂).

Uji sulfur, indol, motilitas

Sebanyak satu ose isolat bakteri ditusukkan dalam medium uji SIM (sulfur, indol, motilitas) yang berupa agar semi solid, lalu diinkubasikan dalam suhu kamar selama 18-24 jam. Jika pada bagian bawah medium berwarna hitam, maka dalam proses fermentasi tersebut dihasilkan H₂S. Untuk uji motilitas positif ditandai adanya penyebaran koloni di sekitar tusukan. Selanjutnya medium ditetesi dengan pereaksi Kovac. Uji indol positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin merah di permukaan medium.

Uji sitrat

Sebanyak satu ose isolat bakteri digores zig-zag pada permukaan agar miring Simmons-citrate, lalu diinkubasikan dalam suhu kamar selama 18-24 jam. Uji sitrat positif ditunjukkan dengan perubahan warna medium tersebut dari hijau menjadi biru.

Uji kemampuan proteolitik dan hemolitik

Karakteristik kemampuan hidrolitik dari isolat bakteri meliputi kemampuan proteolitik dan hemolitik. Medium yang digunakan dalam uji adalah *Blood Agar Plate* untuk kemampuan hemolitik dan TSA yang diperkaya dengan susu skim 1% untuk uji kemampuan proteolitik. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening (*clear zone*) pada medium yang telah berisi isolat bakteri.

Uji aktivitas antagonistik terhadap bakteri

Aeromonas hydrophila

Pengujian aktivitas antagonistik atau konfrontasi dengan bakteri patogen dilakukan dengan metode sumur agar, yang mengacu pada metode menurut Wolf dan Gibbons et al. (1996) dengan modifikasi suhu yang digunakan. Produksi antibakteri dilakukan dengan cara

menginokulasi isolat bakteri sebanyak 0,1 mL ke dalam 10 mL media TSB dan diinkubasi semalam pada suhu 28°C, kemudian disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Filtrat digunakan dalam konfrontasi dengan bakteri patogen uji untuk menentukan dihasilkan atau tidaknya antibakteri.

Bakteri patogen uji yang digunakan adalah bakteri patogen terhadap ikan, yaitu dari strain *A. hydrophila*. Bakteri patogen uji yang telah disegarkan diambil sebanyak 0,2 mL dan dimasukkan ke dalam media NA dan dicampur hingga homogen. Setelah media yang berisi biakan bakteri patogen memadat diberi *paper disk* yang ditetesi dengan substrat antibakteri (filtrat) sebanyak 0,05 mL. Selanjutnya, cawan diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Filtrat yang mengandung substansi antibakteri akan melakukan penghambatan terhadap bakteri patogen yang dibuktikan dengan adanya zona bening di sekitar sumur agar. Besarnya aktivitas antibakteri ditentukan dengan cara mengukur diameter zona bening di sekitar sumur agar.

Analisis data

Data yang telah diperoleh dianalisis secara deskriptif. Identifikasi jenis bakteri yang dapat diisolasi dari saluran pencernaan *A. bicolor bicolor* dilakukan berdasarkan karakter biokimia sesuai dengan tabel biokimia Soemarmo (2000). Untuk potensi isolat sebagai probiotik dinilai dari kemampuan hidrolitik (hemolitik dan proteolitik) dan uji antagonistik terhadap bakteri patogen pada ikan yakni *A. hydrophila*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari saluran pencernaan ikan Sidat *A. bicolor bicolor* diperoleh 11 isolat bakteri berdasarkan perbedaan morfologi koloni bakteri yang meliputi warna, tepian, dan bentuk koloni. Sebelas koloni bakteri yang berhasil diisolasi tersebut diberi kode TSA-a/9-2011, TSA-b/9-2011, TSA-c/9-2011, TSA-d/9-2011, TSA-e/9-2011, TSA-f/9-2011 (1), TSA-f/9-2011 (2), TSA-g/9-2011, TSA-h/9-2011, TSA-i/9-2011, dan TSA-j/9-2011. Tabel 1 menunjukkan karakter morfologi untuk setiap bakteri. Identifikasi masing-masing isolat tersebut dilakukan berdasarkan uji biokimia dimana hasilnya dapat dilihat dalam Tabel 2. Uji karakter biokimia di antaranya berupa uji fermentasi karbohidrat, uji Sulfur, uji motil, uji indol, uji sitrat.

Total jumlah bakteri yang diperoleh per saluran pencernaan ikan yakni sebesar 3×10^8

CFU. Beberapa peneliti melaporkan jumlah bakteri pada ikan yaitu berkisar antara 102- 106 CFU per cm² pada kulit, 103-105 per gram di dalam insang dan sampai 107 atau lebih per gram di dalam usus (Fardiaz et al. 1992). Komposisi jumlah masing-masing isolat dapat dilihat pada Gambar 1.

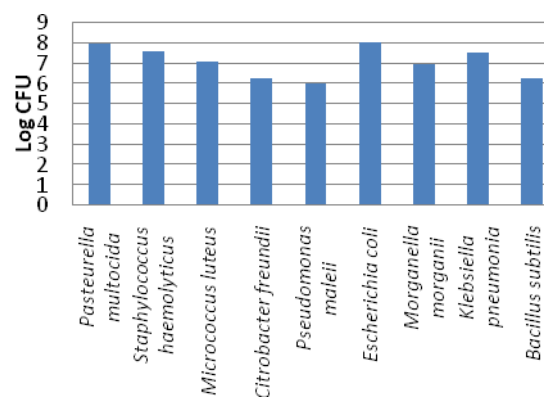
Dari hasil identifikasi, didapati bakteri yang berasosiasi dengan saluran pencernaan ikan sidat mempunyai kemiripan ciri-ciri dengan *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Micrococcus luteus*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas maleii*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Bacillus subtilis*. Terdapat 2 isolat yang teridentifikasi sebagai *E. coli* dan 2 isolat teridentifikasi sebagai *M. luteus*. Dari hasil perhitungan jumlah relatifnya, dapat diketahui bahwa jenis bakteri yang dominan adalah *E. coli*. Mikrobiota pada hewan akuatik dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor. Selain pengaruh spesies, air tempat budidaya dan faktor lingkungan abiotik yang berupa intensitas cahaya, pH dan kelembapan tempat pengambilan sampel, selain pengaruh pakan yang juga membawa mikroorganisme ke dalam saluran pencernaan. Pada hewan akuatik, bagian tubuh yang biasa dikolonisasi oleh bakteri adalah saluran pencernaan dan insang. Pada ikan *Rainbow Trout*, penggunaan *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) pada *cryosection* saluran pencernaan menunjukkan bahwa bakteri dominan berada pada lumen, bukan dinding saluran pencernaan (Spanggaard et al. 2000). Sementara itu, kulit ikan merupakan bagian tubuh yang jarang dikolonisasi oleh bakteri, karena bagian ini selalu berhubungan dengan air. Akan tetapi, pernah dilaporkan adanya bakteri pada kulit ikan *Anguilla anguilla*, yang didominasi oleh *Pseudomonas* spp. (17,23%), *Acinetobacter baumannii* (15,51%), *Stenotrophomonas maltophilia* (12,05%), dan bakteri Gram positif (18,93%) (Ugur et al. 2002). Menurut Austin (2002), bakteri yang umum berasosiasi dengan saluran pencernaan ikan air tawar adalah dari genus *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Carnobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Cytophaga/Flexibacter*, *Bacillus*, *Listeria*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, dan *Vibrio*. Studi metagenomik pada mukus ikan sidat Eropa (*A. anguilla*) menunjukkan bahwa mikroorganisme yang dominan adalah filum *gammaproteobacteria*, dan mikrobiota mukus ternyata sangat berbeda dari lingkungan akuatiknya (Carda-Diequez et

al. 2014). Genus yang muncul pada semua sampel *A. anguilla* pada studi tersebut adalah *Pseudomonas*. Berbagai literatur tersebut menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda dengan penelitian ini.

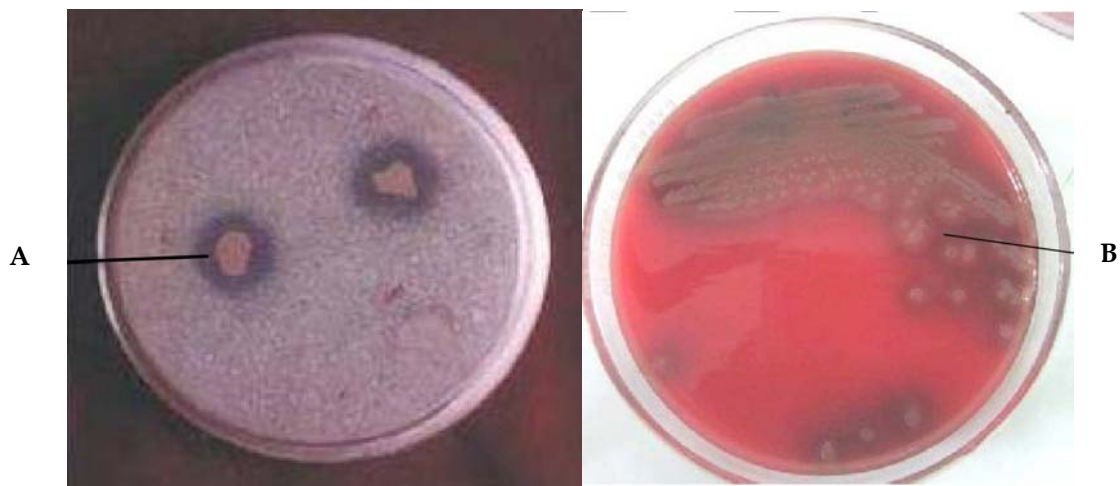
Hasil positif pada uji kemampuan hidrolisis ditandai dengan adanya *clear zone* (daerah bening) di sekitar daerah pertumbuhan bakteri (Gambar 2). Kemampuan hidrolisis yang diuji adalah kemampuan bakteri dalam menghidrolisis protein dan darah. Uji ini digunakan untuk mengetahui bagaimana peranan bakteri dalam saluran pencernaan ikan. Uji kemampuan hidrolisis protein dapat digunakan untuk melihat ada tidaknya kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim proteolitik yang mampu digunakan untuk mendegradasi protein. Sementara itu, uji hidrolisis darah digunakan untuk melihat adanya kemampuan bakteri dalam melisis sel darah. Kemampuan melisis sel darah ini digunakan untuk mengetahui potensi patogenisitas dari suatu bakteri. Sementara itu, degradasi protein dapat digunakan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut berpotensi membantu pencernaan pakan ikan sidat yang terutama berupa protein di saluran pencernaan ikan. Kemampuan hidrolisis isolat bakteri yang dapat diisolasi dari saluran pencernaan *Anguilla bicolor-bicolor* disajikan dalam Tabel 3.

Dari 11 isolat yang didapatkan, 6 isolat menunjukkan kemampuan hidrolisis protein. Mikrobiota pada saluran pencernaan ikan dapat membantu pencernaan inangnya dengan memproduksi enzim hidrolitik untuk mencerna pakan. Hal ini pernah dilaporkan pada ikan oscar, angelfish, dan southern flounder, aktivitas

enzimatik dari isolat bakteri anaerob sangat bervariasi, dan sebagian aktivitas enzimatik tersebut bukan bersifat endogenous bagi inangnya (Ramirez dan Dixon 2003). Bakteri juga dapat membantu nutrisi inang baik secara langsung maupun tidak langsung dengan memproduksi senyawa esensial seperti poliamin, asam amino dan asam lemak esensial (Sugita et al. 1991; Verschuere et al. 2000). Jenis bakteri pada saluran pencernaan ikan sidat *A. bicolor bicolor* didominasi oleh bakteri proteolitik. Hal ini dapat disebabkan karena *A. bicolor bicolor* merupakan ikan karnivora, yang kandungan utama pakannya adalah protein. Aktivitas proteolitik yang dimiliki bakteri pada saluran pencernaan dapat bersifat menguntungkan karena membantu dalam mendegradasi protein, namun pada bakteri tertentu yang bersifat patogen, aktivitas proteolitik ini juga dapat merupakan faktor virulensi bakteri.



Gambar 1. Jumlah setiap jenis bakteri (Log CFU) dalam saluran pencernaan per ekor *A. bicolor bicolor*



Gambar 2. Daerah bening (*clear zone*) uji kemampuan hidrolisis protein (A) dan darah (B)

Tabel 1. Morfologi isolat bakteri yang dapat diisolasi dari saluran pencernaan *A. bicolor bicolor*

Isolat	Koloni			Sel	
	Warna	Tepian	Bentuk	Gram	Susunan
TSA-a/9-2011	Putih keruh	Tak beraturan	Bulat melebar	-	Diplococcus
TSA-b/9-2011	Putih kekuningan	Licin	Bulat	+	Coccus (anggur)
TSA-c/9-2011	Putih susu kekuningan	Licin	Bulat	+	Coccus (anggur)
TSA-d/9-2011	Bening	Tak beraturan	Bulat kecil	-	Batang
TSA-e/9-2011	Putih keruh	Tak beraturan (keriting)	Melebar	-	Batang
TSA-f/9-2011 (1)	Putih	Tak beraturan	Bulat melebar	-	Batang
TSA-f/9-2011 (2)	Putih keruh	Tak beraturan	Bulat besar	-	Batang (coccobacili)
TSA-g/9-2011	Kuning	Licin	Bulat	+	Coccus (mikro)
TSA-i/9-2011	Bening	Licin	Bulat kecil-kecil	-	Batang pendek
TSA-j/9-2011	Putih	Tak beraturan	Bulat melebar	-	Batang
TSA-h/9-2011	Putih susu	Licin	Bulat	+	Batang

Tabel 2. Hasil uji biokimia isolat bakteri yang dapat diisolasi dari saluran pencernaan *A. bicolor bicolor*

Isolat	Uji Biokimia									Nama bakteri berdasarkan kemiripan sifat biokimia
	G	L	Man	Mal	Suk	Sul	Ind	Mot	SC	
TSA-a/9-2011	+	-	+	-	+	-	+	-	-	<i>Pasteurella multocida</i>
TSA-b/9-2011	-	-	-	+	+	-	-	-	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
TSA-c/9-2011	-	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Micrococcus luteus</i>
TSA-d/9-2011	+g	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Citrobacter freundii</i>
TSA-e/9-2011	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas maleii</i>
TSA-f/9-2011 (1)	+g	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
TSA-f/9-2011 (2)	+g	-	-	+	-	-	+	+	-	<i>Morganella morganii</i>
TSA-g/9-2011	+	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Micrococcus luteus</i>
TSA-i/9-2011	+g	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>Klebsiella pneumonia</i>
TSA-j/9-2011	+g	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
TSA-h/9-2011	+	-	+	+	+	-	-	+	-	<i>Bacillus subtilis</i>

Tabel 3. Kemampuan hidrolisis dan aktivitas antagonistik isolat bakteri yang diisolasi dari saluran pencernaan *A. bicolor bicolor*

Isolat	Hidrolisis		Diameter zona bening (mm)
	Protein	Darah	
TSA-a/9-2011	+	+	(α)
TSA-b/9-2011	-	+	(α)
TSA-c/9-2011	-	-	-
TSA-d/9-2011	+	-	6
TSA-e/9-2011	+	+	(β)
TSA-f/9-2011 (1)	+	-	-
TSA-f/9-2011 (2)	+	+	(α)
TSA-g/9-2011	-	-	-
TSA-i/9-2011	+	-	-
TSA-j/9-2011	+	-	-
TSA-h/9-2011	-	-	11

Keterangan: +: dapat menghidrolisis substrat, -: tidak dapat menghidrolisis substrat. α : hemolisis tipe alfa, β : hemolisis tipe beta

Kemampuan hemolisis darah oleh bakteri hemolitik merupakan salah satu faktor virulensi ditunjukkan oleh 4 isolat bakteri asal saluran yang umum dimiliki oleh bakteri patogen pencernaan *A. bicolor bicolor*. Kemampuan Keberadaan bakteri patogen pada saluran

pencernaan ikan dan atau media budi daya dengan populasi yang tinggi sangat merugikan pada usaha budi daya ikan. Hal ini terjadi karena bakteri patogen dapat menimbulkan penyakit dan bahkan kematian masal bagi organisme budi daya. Hal penting yang diperlukan mikrobiota saluran pencernaan adalah berada dalam keseimbangan, yaitu antara bakteri menguntungkan dan bakteri patogen, serta saling berinteraksi antar-spesies bakteri dalam saluran pencernaan, baik secara antagonistik maupun sinergistik. Interaksi yang terjadi sangat penting dalam mempertahankan keseimbangan mikrobiota saluran pencernaan.

Aktivitas antagonistik isolat bakteri yang didapatkan terhadap bakteri patogen pada ikan yakni *A. hydrophila* ditunjukkan pada Tabel 3. Besarnya daerah bening berbeda-beda berdasarkan tingkat daya hambat bakteri terhadap bakteri uji. Berdasarkan data dalam tabel 3, terdapat 4 isolat bakteri yang mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* yakni isolat yang mempunyai kemiripan ciri-ciri dengan *Citrobacter freundii* (6 mm), *Pseudomonas maleii* (3 mm), *Morganella morganii* (8 mm), dan *Bacillus subtilis* (11 mm). Keempat isolat tersebut kemungkinan menghasilkan suatu senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain. Senyawa antibakteri yang dihasilkan mikrobiota dapat berupa asam laktat, peroksida, dan bakteriosin. Mikrobiota pada usus memiliki fungsi perlindungan yang penting untuk menekan bakteri patogen dan virus, dengan mekanisme kompetisi sisi penempelan (reseptor), peningkatan produksi lendir atau mukosa usus, dan kompetisi nutrisi (Salminen dan Wright 1993). Mikrobiota juga diketahui mempengaruhi innate immunity dari ikan inangnya (Gomez dan Balcazar 2008). Keberadaan komunitas bakteri yang seimbang komposisinya juga dapat mencegah bakteri patogen oportunistik untuk berproliferasi dan mengkolonisasi tubuh udang, dan ini merupakan mekanisme pertahanan tubuh yang penting pada tahap larva di mana sistem imunitas belum berkembang sempurna (Skjermo et al. 1997).

Dengan adanya pembatasan penggunaan bahan-bahan antimikroba, dewasa ini modulasi komunitas bakteri yang berasosiasi dengan ikan merupakan solusi yang lebih ramah lingkungan untuk mengatasi masalah penyakit pada kultur ikan. Modulasi komunitas bakteri dapat dilakukan dengan mengintroduksi bakteri yang menguntungkan (probiotik). Bakteri probiotik merupakan bakteri yang aman dan relatif

menguntungkan yang diintroduksi ke inang. Pemilihan probiotik yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan diharapkan akan lebih memudahkan probiotik beradaptasi dengan lingkungan saluran pencernaan ikan sehingga mampu hidup dan berkembang membantu proses pencernaan. Hasil penelitian baru-baru ini telah menunjukkan pengaruh mikrobiota pada survival larva ikan sidat (Sorensen et al. 2014). *Anguilla* merupakan ikan *catadromous* yang siklus hidupnya adalah bertelur di laut dan tumbuh besar di perairan tawar. Para peneliti sejauh ini dengan perlakuan hormonal telah mampu menghasilkan telur dan larva pada *A. anguilla*, tetapi tingkat penetasan dan survival larva sangat rendah. Diketahui bahwa pelekatan mikroorganisme pada permukaan telur selama waktu 24 jam inkubasi sangat mempengaruhi kemampuan survival larva selanjutnya, yang menunjukkan potensi untuk interferensi secara mikrobiologis untuk mensukseskan pengembangbiakan ikan sidat di akuakultur.

Dari hasil penelitian ini, potensi untuk kandidat probiotik bagi budidaya *A. bicolor bicolor* berdasarkan kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* ditunjukkan oleh 4 isolat bakteri, namun tidak semua bakteri tersebut dapat dijadikan sebagai probiotik jika ditinjau dari potensi patogenitasnya. *Pseudomonas maleii* dan *Morganella morganii* mempunyai kemampuan dalam melisis darah sehingga diduga bersifat patogen dan tidak dapat digunakan sebagai kandidat probiotik. *Morganella morganii* juga dilaporkan menghasilkan enzim yang toksik terhadap manusia sehingga tidak dapat digunakan sebagai probiotik. Sumner et al. (2004) menyebutkan bahwa *M. morganii* merupakan salah satu bakteri utama penghasil histamine dalam jumlah yang tinggi sehingga bakteri ini akan membahayakan manusia.

Dengan menyisihkan 2 isolat yang bersifat hemolitik, didapatkan dua isolat bakteri yang berpotensi sebagai kandidat probiotik yakni isolat TSA-d/9-2011 yang mempunyai kemiripan ciri-ciri dengan *Citrobacter freundii* dan isolat TSA-h/9-2011 yang mempunyai kemiripan ciri-ciri dengan *Bacillus subtilis*. Meskipun tidak mampu mendegradasi protein, namun *B. subtilis* ini masih memungkinkan untuk menjadi kandidat probiotik dengan kemampuan penghambatan yang besar terhadap *A. hydrophila*. Beberapa strain *Bacillus* telah digunakan sebagai probiotik yang menghambat pertumbuhan patogen pada ikan (Duc et al. 2004;

Moriarty 1998, 1999; Rengpipat et al. 1998; Sugita et al. 1998; Gomez-Gil et al. 2000; Gullian et al. 2004). Penelitian dengan menambahkan *B. subtilis* pada pakan menunjukkan adanya peningkatan bobot dan efisiensi pakan pada ikan rainbow trout (Gatesoupe 1999). Penggunaan *B. pumilus* sebagai probiotik pada ikan nila meningkatkan *survival rate* secara signifikan, yang diduga karena kemampuannya menghasilkan imunoglobulin G antispora, *pro-inflammatory cytokine tumor necrosis*, dan bacteriocin (Aly et al. 2008). Lebih jauh lagi, Moriarty (1998) menyatakan bahwa spesies *Bacillus* tidak berasosiasi dengan patologi pada organisme akuatik

Sementara itu, *C. freundii* pernah dilaporkan diisolasi dari beberapa spesies ikan seperti *Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella*, dan *Oreochromis niloticus* (Sugita et al. 1985), serta *Balanus amphitrite* (Khandeparker et al. 2003). Spesies bakteri ini juga memiliki aktivitas antagonistik terhadap *A. hydrophila* dan diuji penggunaannya sebagai probiotik untuk ikan nila (*O. niloticus*). Chowdhury dan Wakabayashi (1989) menunjukkan bahwa *C. freundii* efektif menurunkan jumlah dan infektivitas dari *Flexibacter columnaris*. Pemberian *C. freundii* dapat memproteksi terhadap *A. hydrophila* sebesar 70% survival setelah infeksi (Aly et al. 2008). Chowdhury dan Wakabayashi (1989) juga mengkonfirmasi bahwa *C. freundii* tidak bersifat patogen pada ikan.

KESIMPULAN

Terdapat 9 jenis bakteri yang berasosiasi dengan saluran pencernaan *A. bicolor bicolor*: *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Micrococcus luteus*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas maleii*, *Escherichia coli*, *Morganella morgani*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Bacillus subtilis*. Bakteri yang dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik bagi *A. bicolor bicolor* berdasarkan uji hidrolisis darah dan antagonis terhadap bakteri patogen yakni isolat TSA-d/9-2011 (mempunyai kemiripan dengan *Citrobacter freundii*) dan isolat TSA-h/9-2011 (mempunyai kemiripan dengan *Bacillus subtilis*).

DAFTAR PUSTAKA

Aly SM, Abd-El-Rahman AM, John G, Mohamed MF. 2008. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture* 277: 1-6.

Burr G, Gaitlin D. 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *J World Aquacult Soc* 36: 425-436

Cahill MM. 1990. Bacterial flora of the fishes. *Microb Ecol* 19: 21-41.

Carda-Dieguez M, Ghai R, Rodriguez-Valera F, Amaro C. 2014. Metagenomics of the mucosal microbiota of European eels. *Genome Announcement* 2 (6): 1-2.

Chinabut S, Puttinaowarat S. 2005. The choice of disease control strategies to secure international market access for aquaculture product. *Dev Biol* 121: 255-261.

Chowdhury MBR, Wakabayashi H. 1989. Effects of competitive bacteria on the survival and infectivity of *Flexibacter columnaris*. *Fish Pathology* 24 (1): 9-15.

Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM. 2004. Characterization of bacillus probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol* 70 (4): 2161-2171.

Fardiaz S. 1992. Bakteriologi Pengelolaan Pangan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Bogor, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Gatesoupe FJ. 2005. Probiotics and prebiotics for fish culture, at the parting of the ways. *Aqua Feeds: Formulation & Beyond* 2 (3): 3-5.

Gatesoupe FJ. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.

Gomez GD, Balcazar JL. 2008. A review on the interaction between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunol Med Microbiol* 152: 145-154.

Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull JF. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191: 259-270.

Gullian M, Thompson F, Rodriguez J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233: 1-14

Hansen GH, Olafsen JH. 1999. Bacterial interaction in early life stages of marine cold water fish. *Microb Ecol* 38: 1-26.

Heuer OE, Kruse H, Grave K, Colignon P, Karunasagar I, Angulo FJ. 2009. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin Infect Dis* 49: 1248-1253.

Irianto A, Austin B. 2002. Probiotics in aquaculture (review). *J Fish Dis* 25: 633-642.

Khandeparker L, Anil A.C, Raghukumar S. 2003. Barnacle larval destination: piloting possibilities by bacteria and lectin interaction. *J Exp Mar Biol Ecol* 289 (1): 1-13.

Moriarty DJW. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164: 351-358.

Moriarty DJW. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Proc. Eighth Symposium on Microbial Ecology. Microbial Interactions in Aquaculture. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

Nayak SK. 2010. Probiotics and Immunity: A Fish Perspective. *Fish Shellfish Immunol* 29: 2-14.

Olafsen JA. 2001. Interaction Between Fish Larvae and Bacteria in marine Aquaculture. *Aquaculture* 200: 223-243.

Ramirez RF, Dixon BA. 2003. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* 227: 417-426.

Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P. 1998. Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167: 301-313.

Salminen S, von-Wright A. 1993. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, New York.

- Skjeremo J, Salvesen I, Oie G, Olsen Y, Vadstein O. 1997. Microbially matured water: a technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae. *Aquaculture Int* 5: 13-28.
- Soemarmo. 2000. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Klinik*. Yogyakarta: Akademi Analis
- Sorensen SR, Skov PV, Lausen P, Tomkiewicz J, Bossier P, De Schryver P. 2014. Microbial interference and potential control in culture of European eel (*Anguilla anguilla*) embryos and larvae. *Aquaculture* 426-427: 1-8.
- Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, Nielsen T, Appel KF, Gram L. 2000. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture* 182: 1-15.
- Sugita H, Hirose Y, Matsuo N, Deguchi Y. 1998. Production of the antibacterial substance by bacillus species strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* 165: 269-280.
- Sugita H, Miyajima C, Deguchi Y. 1991. The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture* 92: 267-276.
- Sugita H, Tokuyama K, Deguchi Y. 1985. The intestinal microflora of carp *Cyprinus carpio*, grass carp *Ctenopharyngodon idella* and tilapia *Sarotherodon niloticus*. *Bull Japanese Soc Sci Fish* 51 (8): 1325-1329.
- Sumner J, Ross T, Ababouch L. 2004. *Application of Risk Assessment in the Fish Industry*. FAO, Rome.
- Ugur A, Yilmas F, Nurettin S. 2002. Microflora on The Skin of European Eels (*Anguilla anguilla*) Sampled from Creek Yuvarlakcay Turkey. Field Report.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 655-671.
- Vine NG, Leukes W, Kaiser H. 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev* 30: 404-427.
- Wolf CE, Gibbons WR. 1996. Improved method for qualification of bacteriocins. *Appl Bacteriol* 80: 453
- Yosefian M, Amiri MS. 2009. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *African J Biotech* 8 (25): 7313-7318.