

ISOLASI BAKTERI KANDIDAT PROBIOTIK DARI USUS IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*) UNTUK PENGENDALIAN *Streptococcus agalactiae*

Oleh:

Sarbaini¹), Iesje²), Nursyirwani²)
Email: Sarbaini_aban.@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini yaitu mengisolasi bakteri yang berpotensi sebagai probiotik dari usus ikan nila yang dibudidayakan di daerah Provinsi Riau; mengetahui tingkat pertumbuhan bakteri kandidat probiotik pada pH tumbuh 2, 4 dan 6; menguji potensi antibakteri kandidat probiotik dari usus ikan nila (*Oreochromis niloticus*) terhadap bakteri patogen *Streptococcus agalactiae*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode survei dan eksperimen dengan mengisolasi kandidat bakteri probiotik pada usus ikan nila. Bakteri kandidat probiotik yang ditemukan dari usus ikan nila sebanyak 20 isolat. Berdasarkan hasil identifikasi uji fisika, biokimia dan morfologi, isolat kandidat probiotik yang ditemukan terdiri 2 jenis yaitu dari genus *Bacillus* sp dan *Lactobacillus* sp. Dari 20 isolat bakteri tersebut ditemukan dua isolat yang menunjukkan zona hambat terluas, yaitu isolat N-4₂ jenis *Lactobacillus* sp yang menunjukkan zona hambat sebesar 22,7 mm, dan isolat N-6₂ jenis *Lactobacillus* sp dengan zona hambat sebesar 7,2 mm. Hasil identifikasi dengan API 50 CHL *test kit* terhadap isolat N-4₂, dan N-6₂, menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut dikategorikan kedalam *Lactobacillus paracasei* spp NCFB dengan tingkat kemiripan masing-masing sebesar 82% dan 78%.

Kata kunci: Isolasi, kandidat probiotik, *Streptococcus agalactiae*, ikan nila

¹Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Riau

²Dosen Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Riau

ISOLATION OF PROBIOTIC BACTERIAL CANDIDATES FROM the INTESTINE OF NILA (*Oreochromis niloticus*) TO CONTROL *Streptococcus agalactiae*

by:

Sarbaini¹), Iesje²), Nursyirwani²)
Email: Sarbaini_aban.@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of this research was to isolate bacteria that had potential to act as probiotics from the intestine to *Oreochromis niloticus* being cultured in Riau Province; to investigate the optimum growth of at pH 2, 4 and 6; and to test the antibacterial potency of bacterial candidate probiotic against candidate pathogens *Streptococcus agalactiae*. The methods used in this research are Survey and experiments methods were candidate in this research. Probiotic bacteria was isolated from the inner wall of nila intestine. Twenty isolates were obtained from four fish. Identification based on physical, biochemical and morphological characters indicated that the isolates were classified into *Bacillus* and *Lactobacillus* sp. Two of 20 isolate showed highest clear zone against *S. agalactiae*. They were isolate N-4₂ (22.7 mm), and N-6₂ (7.2 mm). Identification by using API CHL 50 Kits identified that the two isolates were categorized into *Lactobacillus paracasei* spp NCFB with similarity of 82% dan 78%, respectively

Key words: isolation, the bacteria candidates probiotics, *Streptococcus agalactiae*, *Oreochromis niloticus*

¹**Student of the Faculty of Fishery and Marine Science, Riau University**

²**Lecturer of the Faculty of Fishery and Marine Science, Riau University**

PENDAHULUAN

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan salah satu jenis ikan konsumsi yang memiliki nilai ekonomis tinggi. Permintaan ikan nila banyak dalam bentuk ikan segar maupun dalam bentuk fillet. Permintaan tersebut mencakup permintaan pasar domestik maupun dari luar negeri seperti Amerika dan Eropa. Produksi ikan nila setiap tahunnya mengalami peningkatan, pada 2008 mencapai volume produksi hingga 220.900 ton (Poernomo, 2009).

Penyakit bakterial merupakan salah satu masalah penting yang sering timbul dalam usaha budidaya ikan air tawar. Salah satu penyakit bakterial yang akhir-akhir ini banyak menyerang ikan nila adalah streptococcosis yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus agalactiae*. Menurut Pasnik *et al.*, (2009) bahwa *Streptococcus agalactiae* banyak menyerang ikan baik pada perairan umum maupun pada ikan budidaya yang menyebabkan banyak terjadinya kerusakan organ yaitu hati bewarna pucat dan bertekstur rapuh.

Wabah bakteri *Streptococcus agalactiae* bersifat akut dan dapat menyebabkan kematian tinggi hingga mencapai 100% pada ikan budidaya (Hernandez *et al.*, 2009). Penanggulangan penyakit bakterial pada ikan sering dilakukan dengan pemberian antibiotik. Akan tetapi, penggunaan antibiotik secara terus menerus dikhawatirkan dapat menyebabkan terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik tersebut. Selain itu meningkatnya isu mengenai keamanan pangan dan keamanan lingkungan kerap menjadi faktor pembatas dalam penggunaan antibiotik. Seiring dengan

perkembangan teknologi, pencegahan penyakit bakterial pun dapat dilakukan dengan penambahan probiotik.

Berdasarkan penelitian mengenai potensi probiotik tersebut di atas, maka peneliti tertarik untuk melakukan isolasi kandidat bakteri probiotik yang berasal dari ikan nila. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandidat bakteri yang berpotensi sebagai probiotik dari ikan nila yang dibudidayakan di daerah Provinsi Riau sehingga nantinya dapat digunakan untuk pengendalian penyakit bakterial *Streptococcus agalactiae*.

BAHAN DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 9 ekor ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Ikan sampel berasal dari kolam budidaya di daerah Kampar dan Pekanbaru. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini S. *agalactiae*, Kertas pH indikator, Alkohol 70%, Aquades, MRS (de Mann, Rogosa, Sharpe) agar, TSA (*Tripticase Soy Agar*, Oxoid), TSB (*Tripticase Soy Broth*), Kertas Medium, O/F basal, Media SIM (*Sugar Indole Motility*), Media MHA (*Mueller Hinton Agar*), Aluminium foil, Kapas dan kain kasa, Pereaksi pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, safranin, alkohol absolut), pereaksi katalase H₂O₂ 3%, Parafin cair, *Disk blank*, HCl 1%, Larutan NaCl, Api 50 CHL Medium

Alat-alat yang digunakan Timbangan analitik, Cawan petri, Tabung reaksi, Erlemeyer, Gelas ukur, Magnetik stirrer, Mortar, Jarum ose, Mikropipet, Vortex, Mikro tube, Laminar flow, Autoclave, Inkubator, Refrigerator, Dissection kit,

Mikroskop, Slide glass dan, cover glass, Akuarium.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode survei dan eksperimen dengan mengisolasi kandidat bakteri probiotik pada usus ikan nila.

Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan kemudian cawan petri dibungkus dengan kertas. Untuk alat-alat seperti tabung reaksi, gelas ukur dan erlenmeyer ditutup ujungnya dengan kapas steril yang telah dibalut kain kasa steril, kemudian di bungkus dengan kertas perkamen dan disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan satu atm selama 15 menit.

- Pembuatan Media Trypticase Soya Agar (TSA)
- Pembuatan Media de Mann, Rogosa, Sharpe agar (MRS)

- Pembuatan Media MHA (Muller Hinton Agar)
- Pembuatan Larutan Fisiologis pH 2, 4, dan 6
- Isolasi Bakteri
- Identifikasi Bakteri
- Uji API CHL 50 Medium

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Kandidat Probiotik pada pH yang Berbeda

Hasil inokulasi bakteri asam laktat dari usus ikan nila (*Oreochromis niloticus*) sebanyak 9 ekor yang ditumbuhkan pada media MRS (de Mann, Rogosa, Sharpe) Agar dengan pH yang berbeda setelah di inkubasi selama 48 jam ditemukan kandidat bakteri probiotik sebanyak 20 isolat. Bakteri kandidat probiotik yang ditumbuhkan pada pH 2, 4 dan 6 tumbuh dengan baik yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 1. Isolat Bakteri Kandidat Probiotik yang Berhasil diisolasi

	pH 2	pH 4	pH 6
Isolasi 1	3 isolat	3 isolat	3 isolat
Isolasi 2	3 isolat	4 isolat	4 isolat
Jumlah	6 isolat	7 isolat	7 isolat

Dari Tabel 1. terlihat bahwa pada pH 4 dan pH 6 tumbuh sebanyak 7 isolat bakteri kandidat probiotik (BAL) dan pH 2 tumbuh sebanyak 6 isolat bakteri kandidat probiotik (BAL). Hal ini sesuai dengan pendapat Jay *et al.*, (2005), yang menyatakan bahwa pH pertumbuhan BAL adalah antara pH 3,2 - 9,6 dan sebagian besar BAL tumbuh pada kisaran pH 4,0 – 4,5. Bakteri asam laktat tumbuh optimum pada pH 5,5 – 5,8. Jenis BAL Strain

Lactobacillus lactis ; *L. Plantarum* dan *L. Fermentum* dapat hidup pada kisaran pH 2,5 – 6,5. Toleransi terhadap pH rendah adalah penting bagi Kandidat BAL untuk hidup dan tumbuh (Nursyirwani, 2013).

Conway *et al.*, (1987) menyatakan bahwa bakteri asam laktat lebih toleran terhadap asam. Penelitiannya menggunakan *L. acidiphillus* mempunyai toleransi yang tinggi terhadap asam lambung

dari pada *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, yang lebih resisten terhadap *S. salivarius* subsp. *Thermophilus*. Secara *in vitro* ketahanan terhadap pH rendah tergantung makanan atau pakan yang digunakan. Jika individu dalam keadaan berpuasa, pH lambung dapat mencapai 1 atau 2 dan banyak mikroorganisme termasuk *Lactobacillus* dapat bertahan hidup dari 30 detik sampai beberapa menit.

Tagg (1976), juga melaporkan bahwa bakteri asam laktat mempunyai toleransi pH dengan rentang yang luas. Bakteri asam laktat juga mampu mempertahankan pH sitoplasma lebih alkali dari pada pH ekstraseluler (Hutkins dan Nannen, 1993). Perbedaan ketahanan membran sel bakteri terhadap kerusakan akibat terjadinya penurunan pH ekstraseluler menyebabkan keragaman ketahanan sel pada pH rendah. Beberapa

peneliti memperkuat pernyataan tersebut Robins-Browne dan Levine (1981) menyatakan bahwa *Lactobacillus delbrueckii* dan *S. salivarius* tidak dapat hidup pada usus halus akibat pH rendah pada lambung.

Tannock *et al.*, (1982) mengindikasikan bahwa strain bakteri yang diisolasi dari indigenous mikroflora dari satu spesies tidak sama dengan spesies lain, meskipun *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* sama-sama diisolasi dari host yang sama tetapi bakteri-bakteri tersebut mempunyai variasi biotypes yang berbeda

Pengamatan Morfologi dan Pewarnaan Gram

Hasil inokulasi bakteri kandidat probiotik dari usus ikan nila (*Oreochromis niloticus*) pada media Agar MRS yang ditemukan sebanyak 20 isolat dapat dilihat pada Gambar 1



Gambar 1. Isolat N-2₂ (*Bacillus*)

Dari Gambar 1 menunjukkan bahwa morfologi dan warna masing-masing isolat kandidat probiotik berbeda, hal tersebut disebabkan karena jenis dan ukuran masing-masing bakteri kandidat probiotik (BAL) berbeda. Hampir semua

koloni masing-masing BAL adalah bewarna krem; krem tua dan kuning.

Setelah dilakukan pewarnaan Gram, ke 20 isolat kandidat BAL termasuk kedalam Gram positif (+). Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pewarnaan dan Pengamatan Morfologi

No.	Isolasi Bakteri	Bentuk Koloni	Warna Koloni	Gram
1	N-2 ₁	Bulat Kecil	Krem	+
2	N-2 ₂	Bulat Besar	Krem Tua	+
3	N-2 ₃	Bulat Besar	Krem Tua	+
4	N-2 ₄	Bulat Kecil	Krem	+
5	N-2 ₅	Bulat Kecil	Krem	+
6	N-2 ₆	Bulat Besar	Krem Tua	+
7	N-4 ₁	Bulat Kecil	Kuning	+
8	N-4 ₂	Bulat Kecil	Krem Tua	+
9	N-4 ₃	Bulat Besar	Krem Tua	+
10	N-4 ₄	Bulat Besar	Krem Tua	+
11	N-4 ₅	Bulat Kecil	Krem	+
12	N-4 ₆	Bulat Besar	Krem	+
13	N-4 ₇	Bulat Kecil	Krem Tua	+
14	N-6 ₁	Bulat Kecil	Krem	+
15	N-6 ₂	Bulat Besar	Krem Tua	+
16	N-6 ₃	Bulat Kecil	Krem Tua	+
17	N-6 ₄	Bulat Kecil	Krem Tua	+
18	N-6 ₅	Bulat Kecil	Krem	+
19	N-6 ₆	Bulat Kecil	Krem	+
20	N-6 ₇	Bulat Kecil	Krem	+

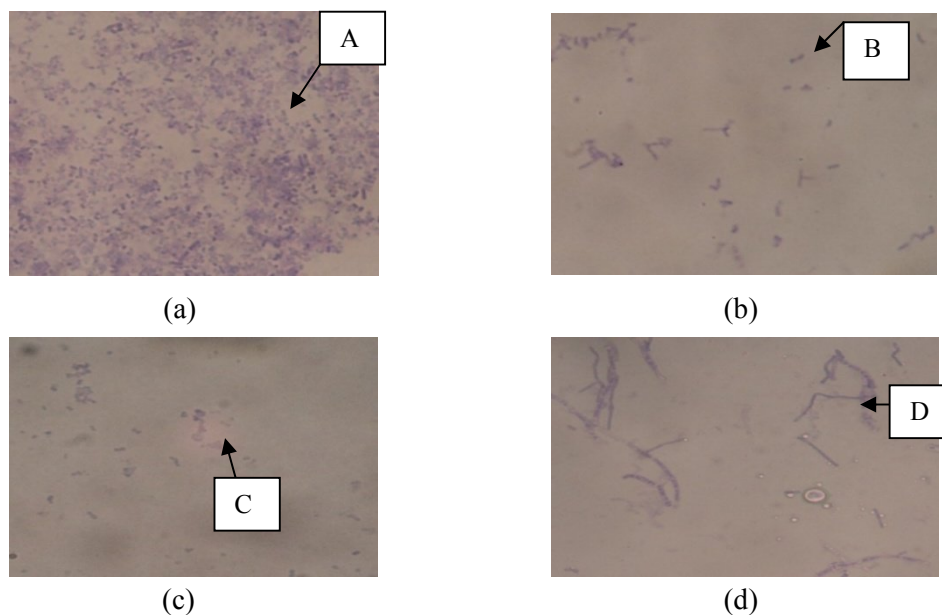
Keterangan : N=Nila; +=Positif

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa semua isolat kandidat probiotik tergolong bakteri Gram (+) yaitu mampu mengikat kuat larutan kristal violet dan pori-pori tidak mudah membesar dikarenakan dinding sel bakteri tidak mengandung banyak lipid sehingga pada saat pencucian dengan alkohol, kristal violet tidak larut. Bakteri probiotik umumnya memiliki ciri-ciri memiliki warna Krem dan Krem tua, bentuk koloni bulat besar dan bulat kecil.

Battcock dan Azam-Ali (1998), juga memberikan penjelasan ciri-ciri yang dimiliki bakteri asam laktat seperti: Gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk cocci atau bacilli, tidak bergerak (non-motil), bereaksi negatif dengan hidrogen peroksida (H₂O₂). Dengan demikian karakteristik isolat kandidat probiotik yang ditemukan adalah karakteristik bakteri asam laktat. Untuk lebih jelasnya

pewarnaan Gram dapat dilihat pada (Gambar 2).

Menurut Fardiaz (1989), bakteri Gram (+) dan (-) dibedakan karena kemampuan dinding sel mengikat kristal violet. Bakteri Gram (+) mampu mengikat dengan kuat kristal violet sedangkan bakteri Gram (-) tidak mampu mengikat dengan kuat kristal violet dikarenakan dinding sel bakteri tersebut mengandung lipid dengan jumlah besar sehingga pada saat dekolonisasi dengan alkohol pori-pori bakteri tersebut membesar dan kristal violet larut dalam alkohol. Hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa seluruh isolat bakteri berwarna ungu dan berbentuk basil/batang. Menurut De Vuyst & Vandamme (1994), bakteri asam laktat yang berbentuk basil/batang termasuk genus *Lactobacillus*, *Bacillus*. Pada pewarnaan spora, seluruh isolat tidak membentuk spora karena berwarna merah.



Gambar 2. Hasil Pewarnaan Gram Bakteri Kandidat Probiotik, (a) Isolat N-2₂ (*Bacillus*), (b) Isolat N-2₃ (*Lactobacillus*), (c) Isolat N-4₂ (*Lactobacillus*), (d) Isolat N-6₂ (*Lactobacillus*)

Uji Biokimia

Hasil penelitian menunjukkan hampir semua isolat menunjukkan oksidase, katalase negatif dan tidak terjadi motilitas. Uji O/F hampir semua menunjukkan oksidase karena tidak terjadi fermentasi baik yang diberikan paraffin maupun yang tidak diberikan paraffin (Tabel 3).

Berdasarkan Tabel 5 bakteri yang diidentifikasi memiliki ciri-ciri yang berbeda. Pada uji katalase bakteri yang memiliki katalase (+) adalah isolat N-2₂, N-2₄, N-2₅, N-4₁, N-4₅, N-4₆, N-6₁, N-6₄, dan N-6₇ dikarenakan bakteri tersebut memiliki enzim katalase dan terjadi pelepasan oksigen yang ditandai dengan adanya reaksi berupa gelembung gas pada saat pentetesannya hidrogen peroksida (H₂O₂) sedangkan yang bakteri katalase (-) yaitu isolat N-2₁, N-2₃, N-2₆, N-4₃, N-4₂, N-4₄, N-4₇, N-6₂, N-6₃, N-6₅, dan N-6₆ tidak terjadi gelembung

gas dan tidak memiliki enzim katalase. Semua bakteri kandidat probiotik tidak menunjukkan motilitas dikarenakan tidak adanya penyebaran pertumbuhan bakteri di media SIM hanya tumbuh pada bagian media yang sudah diberikan bakteri saja. Namun pada isolat N-4₃ terjadi perubahan warna hitam pada media uji motilitas bakteri. Pada uji media TSIA hanya ditemukan 1 bakteri yang menghasilkan H₂S, yaitu isolat bakteri N-4₃. Sehingga dapat disimpulkan bahwa dari hasil uji pewarnaan dan uji biokimia ke 20 isolat bakteri kandidat probiotik yang diidentifikasi mendekati ciri-ciri genus *Bacillus* dan *Lactobacillus*.

Isolat kandidat probiotik yang diperoleh diidentifikasi berdasarkan morfologi pewarnaan gram, pewarnaan spora, uji motilitas. Hasil identifikasi menunjukkan semua isolat berbentuk basil, gram positif, tidak membentuk spora dan tidak bergerak (non-motil) (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil Uji Biokimia

No.	Isolat Bakteri	Katalase	Motilitas	O/F	Acid Fast	H ₂ S	Genus
1	N-2 ₁	-	-	-/+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
2	N-2 ₂	+	-	-/+	+	-	<i>Bacillus</i>
3	N-2 ₃	-	-	-/+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
4	N-2 ₄	+	-	-/+	+	-	<i>Bacillus</i>
5	N-2 ₅	+	-	-/+	+	-	<i>Bacillus</i>
6	N-2 ₆	-	-	-/+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
7	N-4 ₁	+	-	-/+	+	-	<i>Bacillus</i>
8	N-4 ₂	-	-	-/+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
9	N-4 ₃	-	-	-/+	+	+	<i>Lactobacillus</i>
10	N-4 ₄	-	-	-/+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
11	N-4 ₅	+	-	-/+	+	-	<i>Bacillus</i>
12	N-4 ₆	+	-	-/+	+	-	<i>Bacillus</i>
13	N-4 ₇	-	-	-/+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
14	N-6 ₁	+	-	-/+	+	-	<i>Bacillus</i>
15	N-6 ₂	-	-	-/+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
16	N-6 ₃	-	-	-/+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
17	N-6 ₄	+	-	-/+	+	-	<i>Bacillus</i>
18	N-6 ₅	-	-	-/+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
19	N-6 ₆	-	-	-/+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
20	N-6 ₇	+	-	-/+	+	-	<i>Bacillus</i>

Keterangan: N=Nila; +=Positif; -=Negatif; -/+ =Oksidatif Negatif/Fermentasi Positif

Hasil pengamatan secara morfologi menunjukkan uji katalase, pewarnaan gram, dan bentuk sel bakteri sembilan isolat menunjukkan sifat katalase negatif, pewarnaan Gram-positif, dan bentuk sel bakteri berbentuk batang. Isolat *Lactobacillus* dengan memenuhi kriteria mempunyai sifat katalase negatif, pewarnaan Gram-positif, nonmotil, dan bentuk sel batang. *Lactobacillus* mempunyai sifat katalase negatif dan Gram-positif dengan bentukan morfologi basil atau coccobasil. Sedangkan bentuk sel bakteri sebelas isolat menunjukkan sifat katalase positif, pewarnaan Gram-positif, dan bentuk sel batang dan coccus, nonmotil/motil menunjukkan ciri-ciri bakteri dari genus *Bacillus* (Buchanan, 1974)

Buchanan *et al.*, (1974), menyatakan bahwa *Bacillus* bersifat sifat katalase positif, Gram positif, Coccobacilli/bacilli terjadi pembentukan spora positif, motilitas

+/-, produksi indole negatif, pemanfaatan sitrat positif, methyl merah - /+, Oxidase +/-, katalase positif, kanji hydrolysis +/-, Kasein hydrolysis positif, produksi gas dari glukosa negatif. Bakteri kandidat probiotik bersifat oksidatif karena bakteri tersebut mengubah protein dengan bantuan oksigen menjadi asam piruvat sehingga bakteri tersebut memerlukan oksigen untuk melakukan metabolisme dan bakteri ini termasuk bakteri aerob.

Morfologi bakteri berdasarkan pewarnaan Gram, dibedakan menurut komposisi dinding selnya. Bakteri Gram positif (ungu) memiliki dinding sel yang tersusun atas lapisan peptidoglikan yang tebal yaitu 90% dari total komposisi dinding sel. Sedangkan bakteri Gram negatif (merah muda) tersusun atas lapisan tipis peptidoglikan yaitu 10% dari total komposisi dinding sel dan sebagian besar berupa lipid (Smith dan Hussey, 2005).

Menurut Rahayu *et al.*, (1992) untuk tumbuh dengan baik BAL memerlukan kondisi lingkungan yang optimum. Kondisi pertumbuhan optimum untuk bakteri asam laktat pada suhu 30-37°C. Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri yang mempunyai kemampuan untuk membentuk asam laktat dari metabolisme karbohidrat dan tumbuh pada pH lingkungan yang rendah. Secara ekologis kelompok bakteri ini sangat bervariasi dan anggota spesiesnya dapat mendominasi macam-macam makanan, minuman, atau habitat lain. Bakteri asam laktat pada dasarnya mempunyai kesamaan sifat sebagai berikut: (1) berbentuk batang atau kokus, (2) mempunyai karakteristik Gram positif, (3) tidak membentuk spora, (4) tidak motil, (5) tidak membentuk pigmen, (6) Katalase

negatif karena tidak mampu menghasilkan enzim katalase, (7) mampu tumbuh pada larutan garam, gula, dan alkohol tinggi, (8) tumbuh pada kisaran pH 3,0 – 8,0, (9) tumbuh pada berbagai suhu antara 5°C - 50°C (Ribowo dan Ristanto, 1988; Sudarmadji *et al.*, 1989).

Uji Sensitivitas Kandidat Probiotik dengan *Streptococcus agalactiae*

Hasil uji sensitivitas pada medium MHA antara bakteri probiotik dengan *S. agalactiae*, menunjukkan adanya keragaman zona hambat terhadap masing-masing isolat. Zona hambat isolat kandidat probiotik menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *S. agalactiae*. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 3 dan Tabel 4.

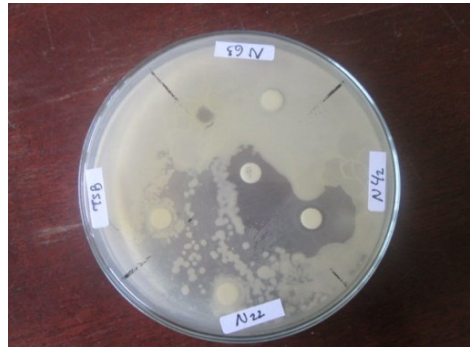
Tabel 4. Diameter Clear Zone Isolat Bakteri Kandidat Probiotik

No.	Isolat	Diameter zona hambat (mm)	No.	Isolat	Diameter zona hambat (mm)
1.	N-2 ₁	-	13.	N-2 ₅	1,4
2.	N-4 ₁	-	14.	N-4 ₅	2,4
3.	N-6 ₁	-	15.	N-6 ₅	2,8
	Antibiotik	34,7		Antibiotik	3,9
4.	N-2 ₂	6,6	16.	N-4 ₆	1,9
5.	N-4 ₂	22,7	17.	N-6 ₆	3,2
6.	N-6 ₂	7,2	18.	N-6 ₈	3,2
	Antibiotik	19,5		Antibiotik	2,9
7.	N-2 ₃	-	19.	N-4 ₇	1,1
8.	N-4 ₃	-	20.	N-6 ₇	2,3
	Antibiotik	33,5		Antibiotik	3,9
10.	N-2 ₄	-			
11.	N-4 ₄	-			
12.	N-6 ₄	-			
	Antibiotik	10,2			

Berdasarkan Tabel 6 terlihat bahwa tidak semua jenis kandidat probiotik yang ditemukan dapat menghambat pertumbuhan *S. agalactiae*. Walaupun zona hambat kandidat bakteri probiotik tidak luas, tetapi hal itu sudah memberikan

indikasi bahwa kandidat bakteri probiotik tersebut mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan patogen yang nantinya dapat diteliti lebih mendalam tentang jenis zat yang menghambat dan konsentrasi tertinggi dari jenis zat

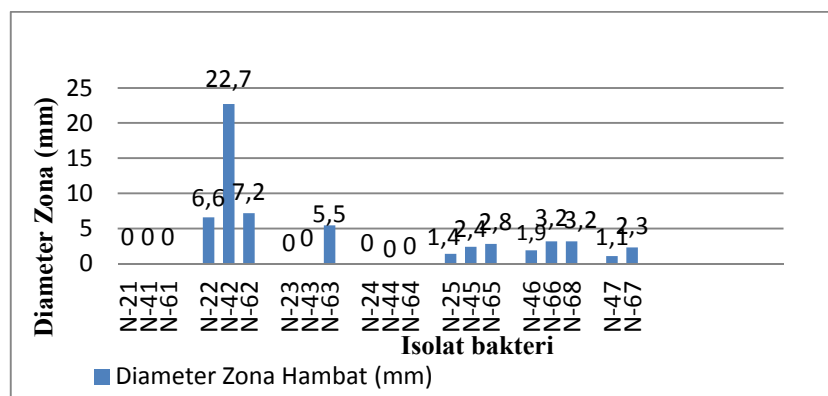
hambat tersebut. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 3



Gambar 3. Zona Hambat Isolat N-2₂, N-4₂, N-6₃, terhadap *S. agalactiae*

Dari Gambar 3 terlihat bahwa dibandingkan dengan *Chloramphenicol* sebagai kontrol positif, kemampuan isolat N-4₂, N-6₂, N-2₂ dan N-6₃ sebagai anti *Streptococcus* cukup tinggi. Ini menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri tersebut dapat digunakan sebagai anti *Streptococcus* menggantikan *Chloramphenicol* yang sering digunakan dalam penanganan penyakit bakterial pada budidaya perairan.

Chloramphenicol bersifat bakteriosidal atau bakteriostatik dengan mekanisme kerja menghambat sintesis protein pada struktur sel yaitu ribosom, pada dosis tinggi dapat berdampak pada hewan dan manusia yang ribosomnya sama dengan ribosom pada bakteri. Antibiotik ini termasuk yang telah dilarang penggunaannya dalam produk makanan oleh FDA karena dapat menginduksi anemia aplastik pada manusia (Serrano, 2005).



Gambar 4. Grafik Uji Sensitivitas Isolat Probiotik terhadap *S. agalactiae*

Berdasarkan Gambar 4, diketahui bahwa 6 isolat kandidat bakteri probiotik tidak dapat menghambat bakteri *S. agalactiae*, dan 12 isolat kandidat bakteri dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. agalactiae*. Zona hambat yang

paling besar terlihat pada ke empat isolat bakteri yaitu isolat bakteri N-4₂ zona hambatnya 22,7 mm, N-6₂ (7,2 mm), dan N-2₂ (6,6 mm), serta N-6₃ (5,5 mm).

Efek penghambatan yang ditunjukkan oleh isolat bakteri asam

laktat dapat disebabkan oleh asam atau substansi seperti bakteriosin (Aslim *et al.*, 2005). Selain produksi bakteriosin sebagai cara kerja antagonistik dari probiotik, produksi asam-asam organik seperti asam laktat dan asam asetat juga penting, seperti aktivitas bakteri asam laktat terhadap patogen pada ikan Turbot (Vazquez *et al.*, 2005 dan asam-asam organik pada salmon asap (Tome *et al.*, 2006).

Zona hambat beberapa kandidat bakteri probiotik tidak sebesar zona hambat antibiotik *Chloramphenicol*. Namun Isolat tersebut merupakan kandidat bakteri probiotik jenis *Lactobacillus* sp. dan *Bacillus* sp. *Lactobacillus* sp merupakan BAL yang paling sering ditemukan pada pencernaan ikan. *Lactobacillus* sp memiliki daya hambat yang cukup besar yaitu 6,6-6,9 mm terhadap pertumbuhan bakteri patogen, dan berdasarkan uji invitro *Lactobacillus* sp. mampu melewati simulasi kondisi lambung dengan pH 2 dan 4. *Lactobacillus* sp. tidak mengubah asam kolat primer (kolat) menjadi asam kolat skunder (deoksikolat), serta dapat menghidrolisis garam empedu (Sujaya *et al.*, 2004).

Berdasarkan Gambar 4, diketahui bahwa 6 isolat kandidat bakteri probiotik tidak dapat menghambat bakteri *S. agalactiae*, dan 12 isolat kandidat bakteri dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. agalactiae*. Zona hambat yang paling besar terlihat pada ke empat isolat bakteri yaitu isolat bakteri N-4₂ zona hambatnya 22,7 mm, N-6₂ (7,2 mm), dan N-2₂ (6,6 mm), serta N-6₃ (5,5 mm).

Efek penghambatan yang ditunjukkan oleh isolat bakteri asam laktat dapat disebabkan oleh asam

atau substansi seperti bakteriosin (Aslim *et al.*, 2005). Selain produksi bakteriosin sebagai cara kerja antagonistik dari probiotik, produksi asam-asam organik seperti asam laktat dan asam asetat juga penting, seperti aktivitas bakteri asam laktat terhadap patogen pada ikan Turbot (Vazquez *et al.*, 2005 dan asam-asam organik pada salmon asap (Tome *et al.*, 2006).

Lactobacillus sp merupakan BAL yang paling sering ditemukan pada pencernaan ikan. *Lactobacillus* sp memiliki daya hambat yang cukup besar yaitu 6,6-6,9 mm terhadap pertumbuhan bakteri patogen, dan berdasarkan uji invitro *Lactobacillus* sp. mampu melewati simulasi kondisi lambung dengan pH 2 dan 4. *Lactobacillus* sp. tidak mengubah asam kolat primer (kolat) menjadi asam kolat skunder (deoksikolat), serta dapat menghidrolisis garam empedu (Sujaya *et al.*, 2004).

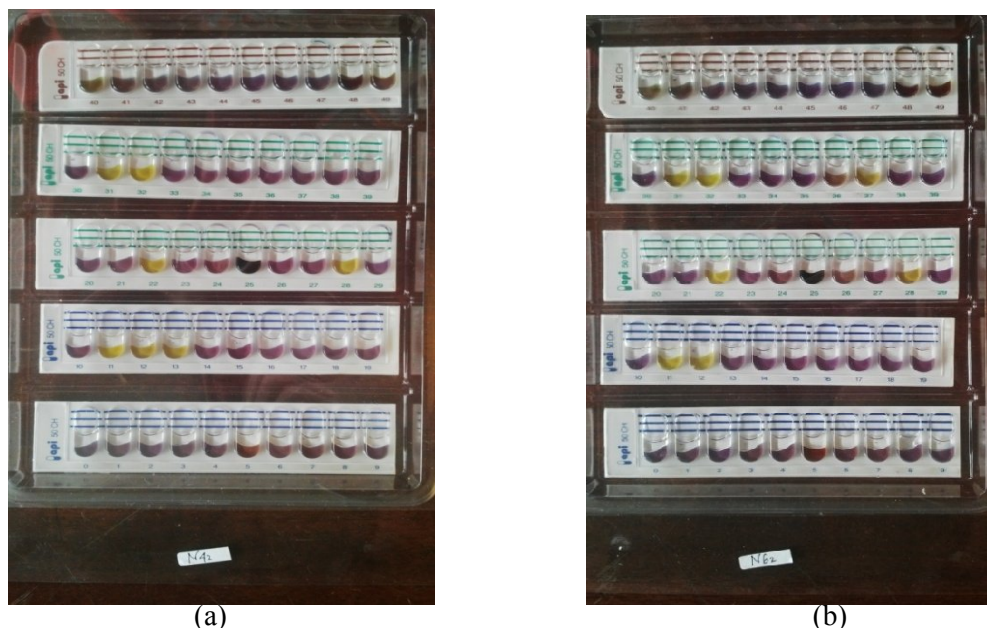
Bacillus sp. memiliki kemampuan memproduksi antibiotik dalam bentuk lipopeptida, salah satunya adalah iturin. Oleh sebab itu seperti pada tabel di atas jenis *Bacillus* sp mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. agalactiae* sebesar 6,92-7,45 mm. Iturin membantu *Bacillus* sp berkompetisi dengan mikroorganisme lain sebagai antibiotik bagi mikroorganisme lain atau menurunkan tingkat pertumbuhannya. Iturin juga memiliki aktivitas antibiotik terhadap bakteri. Dalam sistem akuakultur jenis bakteri *Bacillus* kerap ditemukan pada sedimentasi atau pakan ikan, dimana bakteri ini dimanfaatkan untuk sebagai terapi antibiotik alami terhadap serangan bakteri gram negatif (Buchanan, 1975; Moriarty, 1999). Probiotik melindungi atau memperbaiki

kondisi kesehatan dari dalam saluran pencernaan antara lain dengan menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Santoso *et al.*, 2013).

Identifikasi Kandidat Bakteri Probiotik dengan Uji Api 50 CHL Medium

Hasil identifikasi API 50 CHL *test kit* untuk melihat kemampuan isolat bakteri memfermentasikan 49 jenis gula-gula. Pemilihan identifikasi kedua isolat N-4₂ dan N-6₂ dengan Uji API 50 CHL *test kit* adalah berdasarkan pertimbangan ditemukannya zona hambat yang cukup signifikan 22,7 mm dan 7,2 mm dalam menghambat bakteri *Streptococcus agalactiae* sehingga perlu dilakukannya uji lanjut dengan menggunakan identifikasi API 50 CHL *test kit*.

Isolat N-4₂ memiliki kemampuan dalam memfermentasi 13 jenis gula, perubahan warna menjadi kuning pada (Gambar 10 a) dan merupakan *Lactobacillus paracasei* spp NCFB 206 dengan presentase kemiripan dengan ciri-ciri pada *database* API-LAB *software* sebesar 82% . Isolat N-6₂ dapat memfermentasi 16 jenis gula, warna menjadi kuning (Gambar 10 b) dan merupakan *Lactobacillus paracasei* spp NCFB 206 dengan presentase kemiripan ciri-ciri pada *database* API-LAB *software* sebesar 78%. Perbedaan kedua isolat terletak pada kemampuannya memfermentasi gula α -Methyl-D-Mannoside dan α -Methyl-D-Glucoside. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Perubahan Warna Tabung Berisi Gula-gula dan Isolat Bakteri Waktu 24 jam dan 48 jam (a) isolat N-4₂ (*Lactobacillus*) dan (b) isolat N-6₂ (*Lactobacillus*)

Lactobacillus paracasei adalah spesies bakteri yang memiliki genus yang beragam dan relatif besar

yang memiliki sekitar 90 jenis spesies yang berlisensi. *L. paracasei* disebut juga bakteri fakultatif

heterofermentatif, karena dapat memfermentasi *hexoses* secara baik terhadap BAL, tetapi dapat juga memfermentasi *pentoses* dan glukosa, dan kemudian memproduksi asam asetat laktat (Kandler *et al.*, 1986).

L. paracasei berbeda dari banyak *Lactobacillus* spp dalam hal-hal berikut: 1) *L. paracasei* tumbuh dengan sangat baik dalam keju selama kematangan; 2) Relatif tahan panas; 3) Dapat bertahan pada aktivitas *proteolytic* tinggi. Spesies *L. paracasei* sering ditemukan pada saluran cerna mukosa manusia orang-orang yang sehat (Molin *et al.*, 1993; Ahrné *et al.*, 1998).

L. paracasei 8700:2 telah menunjukkan dalam uji *in vitro* yaitu memiliki sifat antagonistik yang kuat terhadap *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, dan sebuah "peralihan" aktivitas antagonistik terhadap *Helicobacter pylori*, *Shigella sonnei* dan *Escherichia coli* (Hütt *et al.*, 2006).

Berdasarkan hasil tes biokimia dan hasil pengujian maka dapat diketahui bahwa bakteri kandidat probiotik termasuk dalam genus obligat homofermentatif atau fakultatif heterofermentatif *Lactobacillus*. Genus *Lactobacillus* umumnya ditemukan pada substrat yang kaya akan karbohidrat seperti pada membran mukosa manusia, sayur-sayuran, buah-buahan, makanan hasil fermentasi serta makanan membusuk (Rahayu dan Margino, 1997).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan ditemukan sebanyak

20 isolat bakteri kandidat probiotik yang berasal dari usus ikan nila. Berdasarkan hasil identifikasi uji fisika, biokimia dan morfologi isolat kandidat probiotik yang ditemukan ada 2 jenis yaitu dari genus *Bacillus* sp dan *Lactobacillus* sp. Dari 20 isolat kandidat bakteri probiotik zona hambat tertinggi berasal dari isolat N-4₂ jenis *Lactobacillus* sp dengan 22,7 mm, dan isolat N-6₂ Jenis *Lactobacillus* sp dengan zona 7,2 mm.

Hasil identifikasi dengan API 50 CHL *test kit* terhadap 2 isolat N-4₂ dan N-6₂, ditemukan bahwa jenis isolat N-4₂ merupakan bakteri *Lactobacillus paracasei* spp NCFB 206 dengan kemiripan sebesar 82% dan pada isolat N-6₂ yaitu jenis *Lactobacillus paracasei* spp NCFB 206 dengan kemiripan sebesar 78%.

Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu sebaiknya dilakukan untuk uji tantang terhadap ikan untuk melihat patogenitas dari bakteri probiotik *Lactobacillus* sp yang diperoleh agar kandidat probiotik ini bisa digunakan sebagai probiotik untuk meningkatkan imunitas dan produksi ikan di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahrne, G. 1998. Civil and Uncivil Organisations. In: Alexander, J. (ed): Real Civil Societies: Dilemmas of Institutionalization. London: sage, pp. 84-95

- Aslim, B., Z.N. Yuksekdağ, E. Sarıkaya, & Y. Beyatlı. 2005. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT*, 38:691-694.
- Battcock, M. and S. Azam-Ali. 1998. Fermented fruits and vegetables, a global perspective. FAO Agricultural Services Bulletin No. 134. <http://www.fao.org/docrep/x0560e/x0560e10.htm>. Diakses tanggal 18 Juni 2015.
- Buchanan K.E. & Gibbons, N.E. 1974 dan 1975. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th ed). The Williams & Wilkins Company. Baltimore.
- Conway, P.L., S.L. Gorbach, and B.R. Goldin. 1987. Survival of Lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to internal cell. *Journal of Dairy Science* 70:1-12.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Blackie Academic & Professional. Glasgow
- Fardiaz S. 1988. *Fisiologi Fermentasi*. Bogor : Pusat Antar Universitas dan Lembaga Sumber Data Informasi, Institut Pertanian Bogor.
- Fardiaz, S. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. IPB, Bogor.
- Hernandez, E. Figueroa J., and Ireguei C., 2009. Streptococcosis on red tilapia, *Oreochromis* sp., farm : a case study. *Journal of Fish Disease* 32, 247-257.
- Hütt, mukasurat, Shchepetova, J., Loivukene, K, Kullisaar, T. dan Mikelsaar, M. (2006). Kegiatan antagonistik probiotik lactobacilli dan bifidobacteria terhadap entero- dan uropathogens. *Journal of Diterapkan Mikrobiologi* 100: 1324-1332.
- Hutkins, R.W., Nannen, N.L. 1993. pH homeostatis in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 76: 2354-2365.
- Hood, S.K. and E.A. Zottola. 1988. Effect of low on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *Journal of Food Science* 53: 1514-1516.
- Irianto A. 2003. *Probiotik Akuakultur*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press..
- Jay, J.M., M.J. Loessner and D.A. Golden. 2005. *Modern Food Microbiology*. Seventh Edition. Springer science and Business Media. Inc. New York. 790 P.
- Kandler, O. dan Weiss, N. (1986). Regular, nonsporing Gram-tongkat positif, dalam *Manual untuk Bergey Bakteriologi*, Sneath Sistematik, H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. dan Holt, J. Hasta., Williams

& Wilkins, Baltimore, vol. 2, mukasurat 1208-1234.

- Karou, D., Savadogo, A., Canini, A., Yameogo, S., Montesano, C., Simpo, J., Colizzi, V., and Traore, A.S. 2006. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology*. 5(2): 195-200.
- Lancefield, R. C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57:571.
- Levine M. Robins-Browne, R.M. and. 1981. The fate of ingested Lactobacilli in the proximal small intestine. *American Journal of Clinical Nutrition* 34: 514-519.
- Molin, G., Jeppsson, B., Ahrné, S., Johansson, M.-L., Nobaek, S., Ståhl, M., and Bengmark, S. (1993). Numerical taxonomy of Lactobacillus spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines, *J. Appl. Bacteriol.* 74, 314-323.
- Moriarty, W. David J. 1999. Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria. *Jurnal Microbial Interactions in Aquaculture*. Australia.
- Nur, H.S. 2005. Pembentukan Asam Organik oleh Isolat Bakteri Asam Laktat Pada Media Ekstrak Daging Buah Durian (*Durio zibethinus Murr*). *Bioscientiae* Volume 2, Nomor 1 Januari 2005 Halaman 15-24.
- Nursyirwani, W. Asmara, A.E.T.H. Wahyuni dan Triyanto. 2011. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dan Potensi sebagai Antivibrio. *Jurnal Ilmu Kelautan* Vol. 16(2).70-77.
- Nursyirwani, 2013. Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) untuk penanggulangan Penyakit Vibriosis pada Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscoguttatus*). Disertasi Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Madah Yogyakarta.
- Pasnik, D.J., Evans, J.J., Klesius, P.H., 2009. Fecal strings associated with *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Science Journal*, 6-8.
- Poernomo, 2009. Nila, andalan produk perikanan. Available at <http://www.dkp.go.id/archive/s/c/34/1854/nila-andalan-produk-perikanan/> [15 September 2010].
- Rahayu, W.P., S. Ma'oen, Suliatri dan S. Fardiaz 1992. Teknologi Fermentasi Produk Perikanan. Pusat Antar Universitas dan Gizi. IPB. Bogor.
- Rahayu, E.S. dan Margino. 1997. Bakteri Asam Laktat Isolasi

- dan Identifikasi. PAU Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta.
- Saanin, H. 1968 & 1984. *Taksonomi dan Kunci Identifikasi ikan jilid 1&2*. Binacipta anggota IKAPI. Bogor.
- Santoso, B., Maunatin, A., Hariadi, B.T. dan Abubakar, H. (2013). Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat asal rumput raja (*Pennisetum purpureophoides*) sebagai kandidat probiotik pada ternak. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 18(2): 131-137
- Segura M., Gottschalk M. 2004. Extracellular virulence factors of Streptococci Associated With Animal Diseases. *Frontiers in bioscience* 9: 1157-1188..
- Serrano, P.H., 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 469. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 110 p.
- Sharma, H; Behl, RK; Singh, KP; Narula, N; Jain, P. 2007. *Root and plant characters in wheat under low input field conditions with dual inoculation of mycorrhiza and Azotobacter chroococcum: Gene effects*. CEREAL RESEARCH COMMUNICATIONS. 35(4):1573-1582.
- Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL. 2007. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* Serotype. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 2929–2936.
- Smith, A.C. and Hussey, M.A. 2005. Gram Stain Protocol. <http://www.microbelibrary.org/component/resource/gram-stain/2886-gram-stain-protocols>. Diakses tanggal 19 Mei 2015 pukul 10:00.
- Sudjana, M. A. 1991. *Desain dan Analisis Eksperimen edisi III*. Penerbit Arsito, Bandung.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., Suhardi. 1989. *Analisa Bahan makanan dan Pertanian*, Liberty, Yogyakarta.
- Sujaya IN, Antara NS, Sone T, Tamura Y, Aryanta WR, Yokota A, Asano K & Tomita F (2004) Identification and characterization of yeasts in brem, a traditional Balinese rice wine. *World J Microb Biotechnol* 20: 143–150.
- Sun, Y.Z., H.L. Yang, R.L. Ma and W.Y. Lin. 2010. Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29: 803-809.
- Supriady H, Gardenia L. 2010. *Streptococcus* pada ikan nila budidaya di danau Maninjau. Laporan penelitian proyek bantuan sosial Dirjen DIKTI. Pusat Riset Perikanan Budidaya. Jakarta.

- Susanto, R. 1994 dan 1998. *Struktur organ rangka pada ikan*. (tidak diterbitkan). Pekanbaru, 41 hlm.
- Tagg, J.R. 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriology review* 40:722-756.
- Tannock, G.W., O. Szylit, and P. Raibaud. 1982. Colonization of tissue surfaces in the gastrointestinal tract of gnotobiotic animal by **Lactobacillus** strains. *Canadian Journal of Microbiology* 28:1196-1198.
- Tome, Y., P. Teixeira, & P.A. Gibbs. 2006. Anti- listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon. Food commercial cold smoked salmon. *Food Microbiol.*, 23: 399-405.
- Vazquez, J.A., M.P. Gonzales, & M.A. Murado. 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245: 149-161.
- Vine, N.G., W.D. Leukes, H. Kaiser, S. Daya, J. Baxter and T. Hecht. 2004. Competition for attachment of probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 128-136.