

Isolasi bakteri probiotik dari organ pencernaan ikan mas (*Cyprinus carpio*)

(Isolation of probiotic bacteria from digestive organs of carp, *Cyprinus carpio*)

Sintia S. Bella

Mahasiswa Program Studi Budidaya Perairan FPIK Unsrat Manado

Email: sintiabell017@gmail.com

Abstract

The study aimed to isolate probiotic bacteria from the digestive organs of goldfish taken from Fish Hatchery, Tateli. As much as 1 g of the intestine was crushed, put in 9 mL NaCl and centrifuged twice at 1000 rpm for 10 minutes. The supernatant was removed and diluted at a concentration of 10^{-2} - 10^{-3} , then spread on the surface of the MRS media. The bacteria were incubated at 28⁰C for 24-48 hours in the Incubator. The Gram Stain test found that the isolated bacterium was gram positive, biochemical tests found that bacterium isolated from the gut of carp was *Lactobacillus* sp. while pathogenicity test found that there was no mortality of fish until the 14th day after the challenge test. So that it could be concluded that the bacteria obtained could be used as probiotics.

Keywords: probiotic, *Lactobacillus* sp., Gram Stain, pathogenesis

PENDAHULUAN

Budidaya merupakan usaha pemeliharaan organisme air dengan campur tangan manusia dalam proses pemeliharannya untuk meningkatkan produksi dan keuntungan. Karena adanya penangkapan lebih (overfishing) maka aktifitas budidaya menjadi sangat penting di dunia (Cruz *et al.*, 2012). Dalam hal ini akuakultur berkontribusi dalam produksi makanan, bahan baku untuk industri dan farmasitika, ikan hias dan ikan restoking.

Saat ini intensifikasi usaha budidaya telah mendorong peningkatan industri akuakultur secara besar-besaran (Wang *et al.*, 2008). Dalam akuakultur yang intensif ikan dipelihara dengan kepadatan yang tinggi dan sebagai akibatnya, ikan diperhadapkan dengan

kondisi yang menyebabkan ikan semakin stres. Selanjutnya kondisi ini akan merusak kualitas air, meningkatkan kejadian penyakit serta kerugian ekonomi bagi industri.

Saat ini pencegahan dan kontrol penyakit banyak dilakukan dengan menggunakan bahan-bahan kimia dan obat-obatan. Penggunaan bahan-bahan antimikroba untuk pencegahan penyakit telah ditemukan dapat menimbulkan resistensi patogen terhadap antimikroba serta masalah lingkungan yang berkaitan dengan bahan-bahan kimia (Nomoto, 2005; Wang and Xu, 2004). Biswas *et al.* (2012) melaporkan bahwa penggunaan antibiotik atau bahan-bahan kimia secara intensif dan berulang-ulang dapat menyebabkan berbagai pengaruh negatif seperti bioakumulasi, polusi, kekebalan

patogen, merusak mikroba lingkungan serta menekan sistem kekebalan tubuh ikan. Antibiotik dan bahan-bahan kimia meskipun memberikan efek positif pada ikan maupun udang namun penggunaannya tak dapat direkomendasikan karena adanya residu yang terakumulasi dalam daging ikan maupun udang (Citarasu, 2010). Dalam hatchery ikan dan udang, penggunaan antibiotik telah menyebabkan berkembangnya strain patogen yang kebal terhadap antibiotik tersebut (*Antibiotic resistance pathogen*). Oleh karena itu, diperlukan suatu bahan pengganti terhadap penggunaan antibiotik dan bahan-bahan kimia yang aman bagi lingkungan sehingga tercipta akuakultur ramah lingkungan (Environmental Friendly Aquaculture). Salah satu bahan yang berpotensi dan semakin banyak diterapkan adalah probiotik. Penggunaan probiotik dalam budidaya dapat meningkatkan resistensi ikan terhadap penyakit serta meningkatkan pertumbuhan dengan cara meningkatkan efisiensi pakan tanpa merusak lingkungan (Sahu et al., 2008; Sornplang and Piyadeatsoontorn, 2016). Selain memproduksi bahan-bahan antimikroba yang membunuh atau menghambat patogen, probiotik juga memproduksi enzim protease, amylase, dan lipase serta faktor-faktor pertumbuhan seperti vitamin, asam lemak dan asam amino sehingga penyerapan nutrisi menjadi lebih efisien (Kurniasih et al., 2013). Ling et al. (2018) melaporkan bahwa penggunaan probiotik dalam budidaya dapat meningkatkan pertumbuhan, pencernaan pakan, efisiensi pakan, nafsu makan, sistem imun, serta resistensi ikan terhadap patogen. Probiotik dapat diperoleh dari berbagai sumber.

Dalam Praktek Kerja Lapang ini, probiotik diisolasi dari organ pencernaan ikan mas.

METODE PRAKTEK KERJA LAPANG

Sumber Probiotik

Bakteri probiotik dalam praktek lapang ini berasal dari ikan mas berukuran rata-rata 176 gr yang diambil dari Balai Pembenihan dan Pengendalian Penyakit Ikan (BP3I), Tateli. Ikan yang diambil ditangkap langsung dari kolam dan dimasukkan dalam kantong plastik berisi oksigen. selanjutnya, di bawa ke Laboratorium Teknologi Akuakultur FPIK Unsrat.

Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri diambil dari organ pencernaan yaitu usus ikan Mas. Caranya pertama-tama ikan ditimbang kemudian tubuh ikan di bilas dengan alkohol 70% dengan menggunakan tisu. Selanjutnya ikan dibedah menggunakan gunting, organ pencernaan dikeluarkan dan pisahkan usus. Gunting dan peralatan lainnya yang digunakan sebelumnya sudah di sterilkan dengan alkohol 70%.

Usus yang sudah dipisahkan dibersihkan kemudian ditimbang 1 g, dimasukkan dalam mortal dan digerus sampai halus. Hasil gerusan dimasukkan dalam tube dan ditambahkan NaCl 9 ml untuk mendapatkan perbandingan 1:10. Tabung yang sudah berisi gerusan usus kemudian di sentrifuse pada kecepatan 1000 RPM selama 10 menit. Proses sentrifugasi dilakukan sebanyak 2 kali untuk mendapatkan supernatan yang sudah bersih dari sisa-sisa (debris). Langkah-langkah dalam mengisolasi bakteri probiotik adalah sebagai berikut:

- Timbang ikan menggunakan timbangan digitak berketelitian 0,01 g
- Ikan di lap dengan tisu yang sudah diberi alkohol 70%
- Ikan dibedah
- Ambil usus ikan 1 g
- Gerus usus ikan
- Masukkan dalam tabung berisi 9 ml NaCl
- Sentrifuse 10 m pada 1000 RPM
- Supernatan dikeluarkan dan di encerkan sampai 10^{-3}
- Sebar pada media MRS
- Inkubasi pada 28°C

Kultur Bakteri Probiotik

Supernatan yang diperoleh setelah 2 kali disentrifuse selanjutnya di encerkan pada 10^{-2} - 10^{-3} dengan cara ambil 1 mL

Pembuatan Media MRS

Dalam pekerjaan membuat media MRS semua peralatan yang digunakan harus disterilkan terlebih dahulu seperti botol Duran dan cawan Petri. MRS disiapkan dengan cara timbang 6.1 g bubuk MRS dan dilarutkan dengan 100 ml aquades, diaduk sampai tidak terdapat lagi gumpalan dan dididihkan di atas lampu bunsen. Setelah mendidih media selanjutnya diautoclave pada 121°C selama 15 menit dalam Autoclave NB 1100. Bersamaan dengan itu, cawan petri yang akan digunakan sebagai tempat menuang media agar MRS juga di autoclave. Cawan petri yang di autoclave harus dibungkus dengan aluminium foil.

Setelah selesai proses autoclave, media agar dikeluarkan dan diletakkan dalam laminar flow yang sudah disterilkan terlebih dahulu. Begitu juga dengan cawan petri dikeluarkan dan ditempatkan dalam laminar flow untuk dikeringkan.

Selanjutnya media MRS dalam keadaan masih hangat dituangkan dalam

cawan petri dengan ketebalan 5-6 mm, didinginkan dan setelah itu lem dengan selotip agar media tidak mudah terkontaminasi. Pekerjaan ini dilakukan secara aseptik dimana tangan yang mengerjakannya harus memakai sarung setelah sebelumnya sudah dibilas dengan alkohol 70%. Media agar dibungkus dengan aluminium foil dan disimpan dalam lemari pendingin sampai saat digunakan. Secara keseluruhan, prosedur pembuatan media agar MRS sebagai berikut:

1. Cuci botol Duran dan diinfeksi dengan alkohol 70%.
2. Timbang bubuk agar MRS sebanyak 6,1 g dan masukkan dalam botol duran
3. Tambahkan 100 ml aquades kemudian di aduk sampai bubuk terlarut secara merata
4. sesuai petunjuk pembuatan, untuk membuat 1000 ml media dibutuhkan 61,15 g bubuk MRS)
5. Dengan menggunakan lampu bunsen, didihkan media agar tersebut
6. Setelah mendidih, media diautoclave pada suhu 21°C selama 15 menit.
7. Angkat media dan masukkan dalam lamirar flow untuk didinginkan.
8. Dalam keadaan masih hangat media dituangkan dalam cawan petri dengan ketebalan 5-6 mm.
9. Rekatkan cawan petri dengan selotip agar tidak mudah terkontaminasi.
10. Kemudian simpan dalam lemari pendingin sampai saat digunakan.

Identifikasi Bakteri Probiotik

Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram atau metode gram adalah salah satu teknik pewarnaan yang paling penting dan luas yang digunakan

untuk mengidentifikasi bakteri. Dalam proses ini, olesan bakteri yang sudah terfiksasi dikenai larutan-larutan berikut : zat pewarnaan kristal violet, larutan yodium, larutan alkohol (bahan pemucat), dan zat pewarna tandingannya berupa zat warna safranin atau air fuchsin. Metode ini diberi nama berdasarkan penemuannya, ilmuwan Denmark Hans Christian Gram (1853-1938),

1. Rendam kaca preparat dalam alkohol 70% selama kurang lebih 10 menit.
2. Tiriskan dan keringkan kaca preparat
3. Dengan menggunakan kawat ose, ambil bakteri yang sudah dimurnikan secara higienis.
4. Goreskan bakteri pada permukaan kaca preparat secara merata dengan menambahkan sedikit aquades
5. Keringkan selama kurang lebih 5 menit
6. Teteskan 2-3 tetes krista violet dan biarkan selama 1 menit
7. Cuci preparat dengan aquades
8. Teteskan Lugol dan biarkan selama 1 menit
9. Cuci dengan air mengalir selama 1 menit
10. Basahi dengan alkohol 95% dan biarkan selama 30 detik
11. Cuci preparat dengan air mengalir
12. Teteskan larutan Safranin dan biarkan selama 20 detik
13. Cuci dengan air mengalir
14. Amati dengan mikroskop dengan perbesaran 10 kali 100

Bakteri probiotik yang terisolasi diidentifikasi secara morfologi dengan mengamati bentuk sel, serta bentuk dan warna koloni bakteri yang tumbuh pada

media agar. Selanjutnya diidentifikasi melalui pewarnaan Gram dan Uji Biokimia.

Uji Patogenesitas

Uji patogenesitas dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang diperoleh tidak menyebabkan penyakit atau bersifat toksin bagi ikan budidaya. uji patogenesitas dilakukan dengan cara bakteri yang sudah dimurnikan pada media MRS dilarutkan dalam NaCl kemudian dilarutkan untuk mendapatkan konsentrasi 1×10^7 cfu/ml. Selanjutnya secara aseptik ikan disuntik dengan larutan bakteri tersebut sebanyak 0.2 ml/individu ikan dengan menggunakan jarum suntik 1 ml. Penyuntikan dilakukan secara intraperitoneal yaitu disuntik pada rongga perut ikan. Jumlah ikan yang disuntik sebanyak 20 ekor yang dimasukkan dalam 2 akuarium dengan kepadatan 10 ekor/akuarium. Pengamatan terhadap mortalitas dilakukan selama 14 hari setelah ikan di suntik.

Analisis Data

Data hasil praktek dianalisis secara deskriptif kualitatif yaitu dengan cara menjelaskan fenomena yang ditemukan dengan menggunakan rangkaian kata-kata.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri

Hasil isolasi bakteri pertama dari usus ikan mas mendapatkan 2 bentuk koloni yaitu yang satunya berwarna kuning transparan dengan bentuk koloni bulat dan cembung. Koloni yang ke 2 berwarna putih susu dengan ukuran koloni yang lebih kecil, berbentuk bulat dan cembung. Kedua koloni tersebut setelah diisolasi kembali pada media MRS untuk mendapatkan koloni tunggal, yang

diperoleh hanya satu koloni yaitu yang berbentuk bulat cembung dengan warna kuning transparan. Dari hasil pengamatan melalui mikroskop cahaya terlihat bahwa sel bakteri berbentuk batang. Bakteri yang sudah dimurnikan tersebut diidentifikasi melalui uji Pewarnaan Gram. Hasil uji mendapatkan bahwa bakteri yang terisolasi gram positif.

Pewarnaan gram merupakan metode yang paling umum untuk mendeteksi keberadaan suatu bakteri (Lio-Po et al., 2001). Pewarnaan gram akan membagi bakteri kedalam dua kelompok yaitu gram positif dan gram negatif. Gram positif adalah bakteri yang memiliki dinding sel peptidoglycan yang tebal yang akan mempertahankan warna kristal violet pada saat pencucian dengan alkohol 95% dalam proses pewarnaan gram. Dalam kegiatan PKL ini bakteri probiotik yang terisolasi adalah bakteri gram positif.

Setelah uji pewarnaan gram, dilanjutkan dengan uji biokimia. Di Laboratorium KILT, bahan-bahan untuk uji biokimia belum tersedia. Oleh karena itu, identifikasi bakteri probiotik yang ditemukan dilakukan di Laboratorium Balai Karantina Ikan Kelas 2 kota Manado. Hasil uji biokimia menyimpulkan bahwa bakteri yang terisolasi dari usus ikan mas adalah *Lactobacillus* sp. Menurut Snart (2001), *Lactobacillus* sp. merupakan bakteri gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk batang dan sangat fermentatif. Bakteri ini memproduksi asam laktat sebagai salah satu produk utama metabolisme. Bakteri ini juga memproduksi bahan-bahan anti mikroba seperti hydrogen peroxide, diacetyl, reuterin, dan bacteriocins.

Hasil uji patogenesis mendapatkan bahwa tidak terjadi kematian

ikan sampai pada hari ke 14 setelah uji tantang.

Hasil ini menunjukkan bahwa isolat bakteri probiotik yang diisolasi tidak bersifat patogen maupun tidak memproduksi racun yang dapat menyebabkan kematian ikan uji. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa bakteri tersebut dapat digunakan dalam usaha budidaya.

KESIMPULAN

Hasil isolasi bakteri dalam kegiatan PKL mendapatkan bakteri dengan karakteristik berbentuk batang, koloni berbentuk bulat dan cembung dan memproduksi pigmen berwarna putih susu. Bakteri tersebut termasuk Gram Positif melalui Uji Gram (Pewarnaan Gram). Berdasarkan uji Biokimia maka dapat disimpulkan bahwa bakteri probiotik tersebut adalah *Lactobacillus* sp. Bakteri ini dapat digunakan dalam usaha budidaya karena berdasarkan uji patogenesis bakteri ini tidak atau menimbulkan penyakit pada ikan uji maupun tidak menyebabkan efek beracun pada ikan uji. Masalah yang sering dihadapi dalam kegiatan praktek ini adalah sering terjadinya kontaminasi pada media kultur bakteri probiotik. Untuk menghindari hal tersebut maka pekerjaan kultur bakteri perlu memperhatikan kebersihan dan higienitas.

DAFTAR PUSTAKA

- Akter MN, Parvez I, Patwary ZP. 2016. Beneficial effects of probiotics in aquaculture. international journal of fisheries and Aquatic studies. Volume 4(5) : 494-499
- Biswas G., Korenaga H., Takayama H., Kono T., Shimokawa H., Sakai M. 2012. Cytokine Responses in the

- common carp, *Cyprinus Carpio* L. Treated with Baker's yeast extract. *Aquaculture* 356-357: 169-175.
- Citarasu T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International* 18:403-414.
- Cruz PM., Ibanez AL., Hermosillo OAM., Saad HCR. 2012. Use of Probiotics in Aquaculture. *International Scholarly Research Network* Volume 2012. 13 p.
- Fuller R. 1989. Probiotic in man and animals. *Journal of Bacteriology* 66: 365-378.
- Hady JA. 2012. Use of probiotic to improve the growth of farmed New Zealand Abalone (*Haliotis iris*). Thesis. Auckland University of Technology. New Zealand.
- Kurniasih T., Widanarni, Mulyasari I. Melati, Azwar ZI. 2013. Isolation, selection, and identifikasi of bacteria isolated from digestive tract of catfish as probiotic candidate. *Jurnal Riset Akuakultur* Volume 8 No. 2: 277-286.
- Ling Y., Zang R., Ke C., Hong G. 2018. Effects of dietary supplementation of probiotics on growth, immune responses, and gut microbiome of the abalone *Haliotis disvericolor*. *Aquaculture* 493: 289-295.
- Nomoto K. 2005. Prevention of infection by probiotics. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100; 583-592..
- Perker RB. 1974. Probiotics, the other halves of antibiotics. *Animal Nutrition Health* Volume 29: 4-8
- Sahu MK., Swarnakumar NS., Sivakumar K., Thagaradjou T., Kannan L. 2008. Probiotics in Aquaculture: Importance and future perspective. *Indian Journal of Microbiology* 48: 299-308.
- Snart JE. 2001. Screening Methods for Probiotic Lactobacillus Isolated from pig Intestine. Thesis. University of Alberta, Canada. 103 p
- Sornplang P., Piyadeatsoontorn S. 2016. Probiotic isolates from Unconventional Sources : A review. *Journal of Animal Science and Technology* 58:26.
- Wang YB., Li JR., Lin J. 2008. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture* 281: 1-4.
- Wang YB., Xu ZR. 2014. Probiotics Treatment as method of Biocontrol in Aquaculture. *Feed Research* 12: 42-45.