

POTENSI MIKROBA PROBIOTIK DARI IKAN NILA MATI MASAL DI WADUK CIRATA

Eddy Afrianto dan Evi Liviawaty
Universitas Padjadjaran

Abstrak

Identifikasi mikroba lambung adalah studi awal untuk mengembangkan mikroba probiotik untuk meningkatkan efisiensi pakan. Menggunakan nila dari Waduk Cirata sebagai sumber mikroba probiotik yang memasok kebutuhan ikan di waduk. Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimen dan observasi. Saluran pencernaan ikan diambil dan dihancurkan dalam aseptik. Inokulasi mikroba digunakan dengan metode tuang di media nutrisi agar. Mikroba ditanam dan diisolasi untuk mendapatkan kultur murni. Identifikasi mikroba didasarkan pada parameter fisik, kimia, dan organoleptik. Hasil dari percobaan dan pengamatan menunjukkan bahwa *Lactobacillus* sp. dan *Bacillus* sp. berpotensi untuk digunakan sebagai mikroba probiotik.

Kata kunci: Cirata, Identifikasi, Mikroba, Nila, Probiotik

PENDAHULUAN

Kendala utama yang dihadapi oleh pembudidaya ikan adalah efisiensi dalam penggunaan pakan. Ini khususnya bermasalah karena biaya yang diperlukan untuk pasokan pakan yang relatif besar. Salah satu upaya untuk mengatasi kenaikan harga pakan adalah dengan penerapan efisiensi pakan.

Efisiensi dalam penggunaan pakan dipengaruhi oleh kemampuan ikan untuk mengkonsumsi dan menyerap nutrisi yang terkandung dalam pakan. Nutrisi dibutuhkan untuk pertumbuhan ikan. Semakin banyak nutrisi yang diserap, semakin baik pertumbuhan ikan. Semakin banyak nutrisi yang diserap, artinya ikan memiliki pencernaan yang efisien.

Proses pencernaan membutuhkan enzim sebagai katalis (Ahmadi, et. Al., 2012). Kemampuan ikan untuk mencerna pakan tergantung pada jenis dan jumlah enzim yang terkandung dalam saluran pencernaan. Umumnya ikan memiliki enzim yang tidak memadai untuk mencerna pakan. Oleh karena itu, disarankan agar petani lebih memperhatikan metode tentang cara meningkatkan peningkatan jumlah dan jenis enzim yang berperan dalam proses pencernaan.

Enzim dalam saluran pencernaan berasal dari ikan dan mikroba yang hidup di sana (Austin, 2006; Aslamyah, et. Al., 2009). Mikroba memainkan peran penting dalam proses pencernaan, pertumbuhan, dan penyakit yang menyerang inang. Mereka juga membantu pencernaan dengan mengeluarkan enzim untuk memberi makan di saluran pencernaan. Semakin banyak jenis mikroba dalam saluran pencernaan, semakin besar peningkatan jenis dan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk dicerna.

Upaya untuk meningkatkan populasi mikroba di saluran pencernaan dapat dilakukan dengan memanfaatkan isi saluran pencernaan sebagai sumber probiotik (Anjayasari, et. Al., 2013). Bakteri hidup di saluran pencernaan, baik yang asli (asli) maupun yang saling melengkapi (eksogen). Studi dan penelitian tentang mikroflora asli di saluran pencernaan telah banyak dilakukan (Trust and Sparrow, 1974; Munro, et. Al., 1994; Ringo, et. Al., 2002; dan Spanggaard, et. Al. 2000). Selain itu, mikroflora yang berasal dari media hidup dan pakan yang dicakup oleh mikroba juga telah dipelajari (Hansen dan Olafsen 1999; Nicolas, et. Al. 1989).

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan probiotik yang berasal dari nila di Waduk Cirata. Mikroba yang terkandung dalam saluran pencernaan identik dengan yang berada di media hidup. Penggunaan nila dari reservoir Cirata dapat menghasilkan

probiotik spesifik untuk ikan yang dibudidayakan di reservoir. Nila adalah sumber mikroba probiotik yang bagus karena sifatnya yang omnivora. Sebagai omnivora, saluran pencernaannya dihuni oleh mikroba yang mampu menghasilkan protease, lipase, dan karbohidrat.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pemrosesan Produk Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran dari September hingga Desember 2015. Nila (*Oreochromis niloticus*) disampel dari Waduk Cirata selama kematian massal. Ikan diangkut menggunakan coolbox yang diisi dengan es untuk menjaga kesegaran agar mikroba tidak berubah.

Prosedur

Ekstraksi Gastrointestinal

Nila didesinfeksi dengan alkohol 70% untuk sterilisasi. Perut ikan dipotong terbuka dan saluran pencernaan dikeluarkan. Nyali dari saluran pencernaan dihilangkan dengan hati-hati dengan membilas tiga kali menggunakan larutan garam fisiologis (NaCl 0,85). Sebanyak 10 g saluran pencernaan dihancurkan menggunakan mortar dan dihomogenisasi selama satu menit dalam 100 ml larutan garam fisiologis. Larutan standar dibuat dengan mencampurkan 1 ml ekstrak dari saluran pencernaan dan menambahkan 90 ml cairan garam fisiologis yang menghasilkan larutan standar (100).

Inokulasi Mikroba Gastrointestinal

Untuk mendapatkan mikroba probiotik potensial, ekstrak dari saluran pencernaan yang telah dihomogenisasi sebelumnya harus diinokulasi dalam media agar. Lakukan pengenceran dengan mengambil 1 ml larutan standar dan tambahkan 9 ml larutan garam fisiologis (0,85% NaCl) untuk mendapatkan larutan steril 10⁻¹. Buat serangkaian pengenceran 10⁻⁶. Tuang 1 ml setiap konsentrasi ke dalam cawan petri steril. Tuang media agar Rogoso cair (DIBICOTM) ke dalam cawan petri dan aduk rata. Pengadukan dilakukan dengan mendorong piring cawan di permukaan meja membentuk delapan. Cawan petri yang telah diinokulasi dengan mikroba segera diinkubasi dalam inkubator selama 48 jam pada suhu 36°C. Metode inokulasi yang digunakan adalah hasil pengembangan oleh Nakayama, et. Al. (1994). Media yang digunakan untuk pembiakan dan inokulasi mikroba adalah

Rogoso agar (DIBICOTM) dan Tryptone Soya Agar (TSA) dan Trypticase Soy Broth (TSB, Merck) untuk pembiakan mikroba.

Isolasi Mikroba

Untuk mendapatkan mikroba probiotik, perlu dilakukan isolasi populasi mikroba tunggal. Isolasi dilakukan dengan menentukan mikroba dalam cawan petri dari hasil inkubasi yang memiliki morfologi yang khas. Mikroba diinokulasi ulang ke dalam agar Rogoso (DIBICOTM) dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 36oC. Isolasi dapat dilakukan beberapa kali untuk mendapatkan satu jenis mikroba yang diharapkan.

Analisis Data

Setelah memperoleh populasi mikroba tunggal, lakukan identifikasi mikroba berdasarkan bentuk morfologis, fisiologis, dan biokimiawi. Identifikasi morfologis mikroba dilakukan oleh bentuk, ukuran, dan warna mikroba. Koloni morfologi isolat secara visual diamati menggunakan kaca pembesar dan mikroskop seperti yang disarankan pada buku Bergey Manual of Determinative Bacteriology sebagai perbandingan.

Penentuan jenis fisiologi mikroba dilakukan dengan menumbuhkan mikroba dalam media kultur Trypticase Soy Broth (TSB, Merck) plus 1% NaCl. Sumber inokulum adalah pipet untuk 0,5 mL dan diinokulasi ke dalam 10 mL media cair standar. Kultur diinkubasi pada suhu 29 ° C selama 24 jam. Pertumbuhan mikroba

dalam media cair ditandai dengan warna suram dari media kultur standar. Untuk menentukan kemampuan probiotik, serangkaian tes kimia dilakukan untuk mengidentifikasi sifat dan karakter probiotik.

Sifat biokimia mikroba ditentukan dengan pengujian dengan metode difusi sumur untuk mengamati sifat antagonis. Mikroba patogen dan tunggal dikultur dalam Tripty Soy Broth (TSB) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 36oC. Sebanyak 10µl mikroba patogen dilapisi pada media agar kedelai tryptic (TSA) dengan metode swab, sedangkan mikroba tunggal disentrifugasi selama dua menit dengan kecepatan 13000 rpm. Supernatan yang dihasilkan akan digunakan untuk tes antibakteri.

Berdasarkan metode difusi sumur, sifat antimikroba mikroba dapat diidentifikasi dari senyawa antimikroba. Semua isolat diuji sifat antagonisnya terhadap bakteri pembusuk dan patogen. Zona penghambatan diukur dan digunakan sebagai indikator sifat antagonis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil dari penelitian memperoleh 11 isolat bakteri dari saluran pencernaan dari 130 isolat bakteri yang ditemukan, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, dan *Aeromonas* mendominasi sebanyak 63 populasi, atau 48,46 persen dari seluruh populasi bakteri (Tabel 1). Hasil dari pengamatan populasi mikroba di media budidaya juga menunjukkan dominasi yang relatif sama.

Tabel 1. Jumlah Isolat yang Diperoleh dari Saluran Pencernaan Nila

<i>Bacterialisolates</i>	<i>Total Population</i>
Nitrococcus	4
Staphylococcus	24
Moraxella	12
Bacillus	9
Clostridium	8
Aeromonas	19
Citrobacter	8
Carnobacterium	9
Streptococcus	13
Lactobacillus	20
Mycobacterium	4
Total	130

Saluran pencernaan ikan mengandung bakteri menguntungkan yang disebut probiotik (Balaji, et. Al., 2012; Zapata, 2013) dan jumlahnya bisa mencapai ratusan spesies (Tannock, 1995). Beberapa faktor mempengaruhi jumlah dan jenis mikroba di saluran pencernaan, seperti jenis pakan, sumber air, dan karakteristik bakteri inang (Jeffreys, et. Al., 2003). Bakteri dalam media hidup dan kebiasaan makan mempengaruhi komposisi mikroba dalam saluran pencernaan ikan.

Mikroba memiliki karakter khas sehingga dapat digunakan sebagai indikator dalam menentukan spesies. Karakter yang berasal dari saluran pencernaan nila cukup beragam (Tabel 2).

Pembahasan

Istilah probiotik berarti seumur hidup (Tanasupawat, et.al., 2002; Cut Yulvizar, 2013). Tubuh ikan memiliki korelasi dengan mikroba probiotik. Mereka membantu mencerna makanan, membunuh mikroba berbahaya, dan

mempertahankan semua dalam kondisi baik (Sugita, et. Al., 2002).

Ikan memiliki kontak dengan mikroba di sekitarnya. Mereka terus menerus melalui saluran pencernaan melalui air atau makan. Untuk alasan ini, transfer mikroba dari lingkungan selalu terjadi dan itu mempengaruhi ekosistem di saluran pencernaan. Dengan demikian, mikroba yang ditemukan di saluran pencernaan relatif mirip dengan yang ada di media hidup atau pakan yang dikonsumsi.

Mikroba ini berperan dalam pencernaan serat dan formulasi vitamin tertentu, serta mencegah infeksi usus yang disebabkan oleh patogen (Walter, et. Al., 2000). Dalam saluran pencernaan vertebrata, bakteri telah diidentifikasi memiliki peran penting yang memengaruhi proses metabolisme. Bakteri mampu mencerna karbohidrat (Turnbaugh, et. Al., 2006) dan menjaga cadangan lemak (Backhed, et. Al., 2004)

Jumlah dan komposisi populasi mikroba dalam saluran pencernaan dipengaruhi oleh perkembangan saluran, mikroba yang berasal dari media budidaya dan pakan alami, komposisi dan suhu pakan buatan (Ringo dan Birkbeck, 1999).

Tabel 2. Sifat Isolasi Mikroba

<i>Sifat Jenis Mikroba</i>						
<i>Bentuk Morfologis</i>				Bentuk Sel	Pewarnaan Gram	<i>Tipe Mikroba</i>
<i>Koloni</i>	<i>Tepi sel</i>	<i>Permukaan</i>	<i>Warna</i>			
bulat kecil	tidak teratur		<i>Merah kekuningan</i>	bulat kecil	negatif	<i>Nitrococcus</i>
bulat besar	Pinggir datar	menipis ke tepi	<i>krem</i>	bulat kecil	positif	<i>Staphylococcus</i>
bulat sedang	Pinggir datar		<i>Krem tua</i>	batang	negatif	<i>Moraxella</i>
bulat kecil	Pinggir datar		<i>Krem tua</i>	<i>koma</i>	negatif	<i>Bacillus</i>
bulat besar	<i>Tepi bergerigi, tidak beraturan</i>	dalam bulat datar tepi rata	<i>bening</i>	<i>koma</i>	positif	<i>Clostridium</i>
bulat kecil		dalam bulat datar tepi rata	<i>krem</i>	batang	negatif	<i>Aeromonas</i>
<i>Bulat kecil seperti titik</i>			<i>bening</i>	batang	positif	<i>Citrobacter</i>
<i>titik</i>	tidak teratur		<i>krem</i>	bulat kecil	negatif	<i>Carnobacterium</i>
<i>Bulat kecil</i>	datar		<i>krem</i>	bulat kecil	positif	<i>Streptococcus</i>
<i>Bentuk tidak teratur</i>	tidak teratur	bulat kecil krem dalam	<i>Krem tua dibagian tengah, bening dibagian tepi</i>	batang	positif	<i>Lactobacillus</i>
<i>Bulat besar</i>	tidak teratur	<i>bergelombang</i>	<i>krem</i>	batang	positif	<i>Mycobacterium</i>

SIMPULAN

Berdasarkan identifikasi, beberapa mikroba diketahui motil, yaitu Nitrococcus, Bacillus, Clostridium, Aeromonas, dan Citrobacter; sedangkan Streptococcus, Lactobacillus dan Mycobacterium adalah non-motil. Pergerakan ini dimungkinkan karena mikroba memiliki alat gerak yang disebut flagella.

Staphylococcus, Citrobacter, Aeromonas, Lactobacillus, dan Clostridium memiliki kemampuan untuk mengambil keuntungan dari proses fermentasi menggunakan karbohidrat dan mengubahnya menjadi asam dan CO₂ untuk mengendalikan lingkungan menjadi asam. Akibatnya, pertumbuhan mikroba pembusukan dan patogen menjadi terhambat.

Staphylococcus dan Moraxella adalah katalase positif, yang berarti bahwa mikroba ini memiliki kemampuan untuk memecah hidrogen peroksida yang berbahaya (H₂ O₂). Proses ini menghasilkan air dan senyawa tidak berbahaya lainnya. Streptococcus, Bacillus, Lactobacillus, dan Clostridium adalah katalase negatif.

Bakteri asam laktat (LAB) mampu menghasilkan senyawa seperti asam laktat, hidrogen peroksida, diacetyl, asetaldehida, dan bakteriosin. Senyawa memiliki sifat antibakteri sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroba patogen (Ringo dan Gatesoupe, 1998; Gatesoupe, 1999). Beberapa ahli berpendapat bahwa BAL adalah penghuni saluran pencernaan pada ikan (Nikoskelainen, et. Al., 2001) yang tidak menyebabkan efek samping (Ringo, et. Al., 2002).

Lactobacillus adalah genus bakteri dari BAL. Bakteri ini adalah gram positif karena mereka membentuk lapisan peptidoglikan yang tebal. Lactobacillus adalah anaerob fakultatif atau mikroaerofilik yang dapat hidup di lingkungan dengan kandungan oksigen rendah.

Kemampuan spesifik Lactobacillus untuk mengubah laktosa dan gula lain menjadi asam laktat juga merupakan noticebale. Sebagian besar bakteri ini adalah umum dan tidak berbahaya bagi kesehatan. Asam laktat mampu membuat lingkungan menjadi asam. Kondisi tersebut dapat mengganggu pertumbuhan beberapa bakteri berbahaya. Bakteri bertindak sebagai flora normal dalam sistem pencernaan, fungsinya adalah untuk menjaga keseimbangan asam dan basa untuk tingkat pH konstan dalam usus besar (Hardiningsih, 2006; Haetami, et. Al., 2008).

Selain menghasilkan asam laktat, bakteri Lactobacillus juga mampu menghasilkan hidrogen peroksida dan bakteriosin. Kedua senyawa ini beracun, sehingga sering digunakan untuk membunuh mikroba patogen dan pembusukan.

Bakteri Bacillus mampu hidup di berbagai habitat dan mampu menguraikan senyawa kompleks menjadi yang lebih sederhana. Mereka mengambil bagian dalam proses dekomposisi senyawa organik karena sifat amilolitik, proteolitik, lipolitik, antibiotik, selulolitik yang memiliki potensi besar untuk dikembangkan dalam industri bioteknologi (Harmanti, 2000)

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadi, H., Iskandar and N. Kurniawaty. 2012. Pemberian Probiotik dalam Pakan terhadap Pertumbuhan Lale Sangkuriang (*Clarias gariepinus*) pada Pendederan II. *Jurnal Perikanan dan Kelautan* Vol. 3 No. 4 December 2012. pp. 99-107.
- Aslamyah, S., H.Y. Azis, Sriwulan and K.G. Wiryawan. 2009. Mikroflora Saluran Pencernaan Ikan Gurame. *Torani* Vol. 19 (1): pp. 66-73.
- Anjayasari, D., D.A.Astuti and R.A. Afandi. 2013. Efektivitas Probiotik terhadap Pertumbuhan Total Populasi Mikroflora Saluran Pencernaan Ikan Mas dan Deposisi Lemaknya. *Berkala Perikanan Terubuk*, February 2013. pp. 84-89.
- Austin, B. 2006. The Bacterial Microflora of Fish, Revised. *The Scientific World Journal* (2006) 6, pp. 931-945.
- Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, et. al. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: pp. 15718–15723.
- Balaji, N., Rajasekaran, K.M., Kanipandian, N. Vignesh, V., and Thirumurugan, R. 2012. Isolation and Screening of Proteolytic Bacteria from Freshwater Fish *Cyprinus carpio*. *International Multidisciplinary Research Journal* 2012, 2(6): pp.56-59.
- Cut Yulvizari. 2013. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik pada *Rastrelliger* sp. Isolation and Identification of Probiotic Bacteria in *Rastrelliger* sp. *J.Biospecies* Vol. 6 no.2. 2013. pp. 1-7.
- Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 191, 147-165. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00187-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00187-8)

- Haetami, K., Abun and Y. Mulyani. 2008. *The Study Of Processed Probiotic BAS (Bacillus licheniformis, Aspergillus niger, and Sacharomices cerevisiae) as Feed Supplement and Its Implicated on Red Nile*. Research Report. Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Unpad.
- Hansen, G.H., and J.A. Olafsen. 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology* 38: pp. 1-26.
- Hardiningsih, R., R.N.R. Napitupulu and T. Yulinery. 2006. Isolasi dan Uji Resistensi Beberapa Isolat Lactobacillus pada pH Rendah. *Biodiversitas* Volume 7, Nomor 1 Januari 2006. Halaman: 15-17. <http://biodiversitas.mipa.uns.ac.id/D/D0701/D070105.pdf>
- Harmanti, A. 2000. Pengenalan Bacillus Spp. *Oseana*, Vol XXV, No. 1, 2000: pp. 31-41.
- Munro, P.D., A. Barbour, and T.H. Birkbeck. 1994. Comparison of the gut bacterial flora of start-feeding larval turbot reared under different conditions. *Journal of Applied Bacteriology* 77: pp.560-566.
- Nakayama, A, Y. Yano and K. Yoshida. 1994. New Method for isolating Barophiles from Intestinal Content of Deep-sea Fishes Retrieved from The Abyssal Zone. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(11): pp. 4210-4212.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., & Bylund, G. (2001). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, 198, 229-236. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00593-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00593-2).
- Nicolas, J.L., R. Robic, and D. Ansquer. 1989. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture* 83: pp. 237-248.
- Ringo, E., and T.H. Birkbeck. 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research* 30: pp. 73-93.
- Ringo, E., Seppola, M. Berg, A., Olsen, R.E., Schillinger, U., and Holzappel, W. 2002. Characterization of *Carnobacterium divergens* strain 6251 Isolated from intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Syzt. Appl. Microbiol.* 25: pp. 120-129.
- Ringø, E., Gatesoupe, F. J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160, 177-203. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00299-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00299-8).
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Nielsen, T., Appel, K.F. and Gram, L. (2000) The microflora of rainbow trout: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture* 182:pp. 1–15.
- Sugita, H., Okano, R., Suzuki, Y., Iwai, D., Mizukami, M., Akiyama, N., Matsuura, S. 2002. Antibacterial Abilities of Intestinal Bacteria from Larval and Juvenile Japanese Flounder Against Fish Pathogens. *Fish. Sci.* 68: pp. 1004-1011.
- Tanasupawat, S., Thongsanit, J., Keeratipibul, S., and Jatikavanich, S. 2002. Characterization and Identification of *Tetragenococcus halophilus* and *Tetragenococcus muriaticus* strains from Fish Sauce (Nam-pla). *Jpn. J. Lactic Acid Bact.* 13(1): pp. 46-52.
- Tannock G W. 1995. *Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body*. London, United Kingdom: Chapman and Hall.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, et al. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: pp. 1027–1131.
- Trust, T.J. and Sparrow, R.A.H. 1974. The Bacterial Flora in The Alimentary tract of Freshwater Salmonid Fish. *Can.J.Microbiol.* 20:pp. 1219-1228.
- Verner-Jeffreys, D.W., Shields, R.J., Bricknell, I.R., and Birkbeck, T.H., 2003, Changes in the gut associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae in three British hatcheries. *Aquac.*, 219:pp.21-42.
- Walter, J., G. W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong, D. M. Loach, K. Munro, and T. Alatosava. 2000. Detection and Identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. *Appl Environ Microbiol.* Jan 2000; 66(1): pp. 297–303.
- Zapata, A.A. 2013. Isolated from Nile Tilapia Intestine (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Biology and Life Science* 2013, Vol. 4, No. 1