

Isolasi Bakteri Selulolitik *Staphylococcus* sp. JC20 dari Saluran Pencernaan Gurita (*Octopus* sp.) untuk Kandidat Probiotik Ikan

Isolation of Cellulolytic Bacterium *Staphylococcus* sp. JC20 from the Intestine of Octopus (*Octopus* sp.) for Fish Probiotic Candidate

Indah Istiqomah*, Alim Isnansetyo, Imelda Novita Atitus & Ahmad Fauzi Rohman

Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

*Corresponding author: email: indah_ist@ugm.ac.id

Submitted 09 October 2018 Revised 11 November 2018 Accepted 06 December 2019

Abstrak Penelitian ini bertujuan untuk isolasi, karakterisasi, dan identifikasi bakteri selulolitik dari saluran pencernaan vertebrata dan avertebrata laut sebagai kandidat probiotik. Bakteri diisolasi dari saluran pencernaan dan ditumbuhkan pada medium selulosa agar. Skrining bakteri dilakukan berdasarkan aktivitas selulolitik, ketahanan pH asam, kemampuan antagonisitas terhadap bakteri patogen ikan, ketahanan terhadap antibiotik, kemampuan hidup pada saluran pencernaan ikan, dan uji non-patogen. Bakteri terpilih diidentifikasi secara molekuler berdasarkan sekuen gen 16S rDNA dan secara fenotipik. Total sebanyak 14 isolat menunjukkan index selulolitik 1,1-1,8. Isolat yang memiliki index selulolitik >1,6 diseleksi lebih lanjut dengan kriteria di atas sehingga mendapatkan 1 strain terpilih, yaitu isolat JC20 yang berasal dari saluran pencernaan gurita (*Octopus* sp.). Isolat JC20 bersifat sensitif terhadap antibiotik, tahan terhadap pH asam, mampu hidup pada saluran pencernaan ikan dan tidak patogen, sehingga potensial untuk dikarakterisasi lebih lanjut untuk digunakan sebagai probiotik ikan. Identifikasi secara molekuler dan fenotipik menunjukkan bahwa isolat JC20 adalah *Staphylococcus* sp.

Kata kunci: Bakteri; selulolitik; probiotik candidate; skrining; identifikasi; *Staphylococcus* sp.

Abstract Aim of this study was to isolate, characterize, and identify cellulolytic bacteria from the digestive tract of marine vertebrates and invertebrates as a candidate of fish probiotics. The bacteria were isolated from the digestive tract and grown on a cellulose agar plate. The bacteria were screened based on the cellulolytic activity, acid resistance, antagonist activity against fish pathogens, antibiotics sensitivity, ability to live in fish digestive tract and non-pathogenic test. Selected bacterium was identified molecularly, based on the 16S rDNA gene sequences, and phenotypically. A total of 14 bacteria demonstrated celulolitic index of 1.1-1.8. The bacteria with cellulolytic index of > 1.6 were screened by the selection criteria, resulted a selected strain, JC20 isolate which was isolated from the digestive tract of octopus (*Octopus* sp.). The selected bacterium was sensitive to antibiotics, resists to acidic environment, able to live in the fish digestive tract, and non-pathogen. Thus, the bacterium was potential for further characterization as fish probiotics candidate. Molecular and phenotypic identification revealed that JC20 isolate was *Staphylococcus* sp.

Keywords: Bacteria; cellulolytic; probiotics candidate; screening; identification; *Staphylococcus* sp.

PENGANTAR

Akuakultur merupakan sektor produksi pangan yang paling cepat berkembang di dunia. Menurut Kementerian kelautan dan perikanan Indonesia, kontribusi produksi perikanan budidaya terus meningkat dan mencapai 16,7 juta ton pada tahun 2017. Hal ini menunjukkan bahwa dalam 5 tahun ke belakang dan beberapa tahun ke depan, perikanan budidaya memiliki potensi yang cukup besar bagi produksi perikanan Indonesia.

Pakan merupakan salah satu faktor penting yang menentukan pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan budidaya. Masalah yang sering mengganggu para pembudidaya ikan adalah harga pakan yang semakin tinggi sehingga budidaya ikan sering terpaksa menggunakan pakan dengan harga terjangkau meskipun dengan kecernaan yang rendah. Pakan yang kurang tercerna dengan baik berdampak pada pertumbuhan yang

tidak optimum dan banyaknya bahan organik di media budidaya. Oleh karena itu, efisiensi penggunaan pakan oleh ikan perlu dioptimalkan.

Salah satu alternatif untuk dapat meningkatkan efisiensi serapan pakan di saluran pencernaan adalah dengan penggunaan probiotik. Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang cukup, dapat memberi manfaat perbaikan keseimbangan mikroflora dan meningkatkan kesehatan (Verchuere *et al.*, 2000; Balcazar *et al.*, 2006; Davis, 2014). Probiotik telah terbukti mampu serapan nutrisi maupun memperbaiki kualitas air budidaya ikan, sistem imun, sintasan dan pertumbuhan ikan. Beberapa probiotik yang telah banyak digunakan pada budidaya ikan, udang, abalone, bivalvia dan organisme air lainnya, yaitu *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Nitrosomonas*, *Cellulomonas*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodospseudomonas*, *Nitrosomonas*, *Acinetobacter*, yeast and diatom (Gatesoupe, 1999; Verchuere *et al.*, 2000; Balcazar

et al., 2006). Kemampuan probiotik untuk memperbaiki proses pencernaan ikan diantaranya berkaitan dengan kemampuan produksi enzim amilase, protease, lipase, dan selulase yang biasanya dimiliki oleh ikan dan makhluk air lainnya dalam jumlah terbatas (Kurniasih et al., 2013). Isnansetyo et al. (2009) menemukan bakteri probiotik dari air laut sebagai agen biokontrol dengan aktivitas antibakteri yang sangat kuat. Irianto et al. (2006) membuktikan adanya perbaikan sistem imun nila oleh aplikasi probiotik. Soepriyanto et al. (2018) menemukan adanya perbaikan produksi pembesaran sidat yang diberi pakan berprobiotik. Hal ini menunjukkan adanya peluang yang besar bagi pengembangan probiotik untuk budidaya ikan.

Saluran pencernaan ikan mengandung mikroba yang potensial untuk digunakan sebagai probiotik ikan. Penelitian ini bertujuan untuk isolasi, karakterisasi, dan identifikasi bakteri selulolitik dan proteolitik dari saluran pencernaan vertebrata dan avertebrata laut laut untuk digunakan sebagai kandidat probiotik.

BAHAN DAN METODE

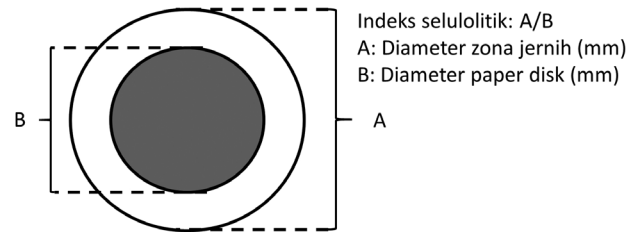
Isolasi bakteri

Bakteri diisolasi dari saluran pencernaan vertebrata dan atau avertebrata laut, yang dipilih secara acak di Tempat Pelelangan Ikan Mlongo, Kabupaten Jepara, Jawa Tengah, yaitu Kakap merah utara (*Lutjanus sp.*), kerapu (*Epinephelus sp.*), bandeng (*Chanos chanos*), cumi-cumi (*Loligo sp.*), dan gurita (*Octopus spp.*) Ikan dibedah secara aseptis kemudian dibuka pada saluran pencernaan untuk isolasi bakteri menggunakan jarum ose steril dan inokulasi pada medium *Carboxyl Methyl Cellulose* (CMC) agar 1%. Koloni bakteri yang tumbuh setelah inkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam dipilih berdasarkan morfologi koloni selanjutnya dimurnikan menggunakan medium tryptone soya agar (TSA, Oxoid) dan disimpan dalam tryptone soya broth (TSB, Oxoid) dengan 25% gliserol pada suhu -80°C.

Seleksi bakteri

Seleksi berdasarkan aktivitas selulolitik

Aktivitas selulolitik diukur secara kualitatif berdasarkan zona jernih yang dihasilkan oleh bakteri. Bakteri ditumbuhkan pada TSA selama 24 jam dan dilarutkan dalam fosfat buffer pH 7.0 sehingga memiliki kepadatan 10^6 sel/ml. sebanyak 20 µl larutan bakteri diteteskan pada paperdisk (Advantec) steril dan dikeringanginkan selama 15 menit. Paperdisk yang telah mengandung bakteri tersebut kemudian diletakkan diatas CMC agar dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Pengamatan aktivitas selulolitik dilakukan dengan meneteskan larutan *congo red* 1% keseluruhan permukaan medium sehingga terlihat adanya zona jernih disekitar paperdisk sebagai indikator adanya aktivitas selulolitik. Zona bening yang terbentuk di sekeliling paper disk diamati dan diukur diameternya. Indeks selulolitik ditentukan dengan membandingkan diameter zona jernih dengan diameter paperdisk (Gambar 1). Pengamatan aktivitas selulolitik tiap isolat dilakukan dengan dua ulangan untuk melihat konsistensinya.



Gambar 1. Penghitungan indeks selulolitik.

Uji tahan asam

Uji tahan asam dilakukan dengan inokulasi bakteri apda medium *Tryptone Soya Broth* (Merck KGaA Germany) yang memiliki pH 4 (asam) dan pH 7 (netral, kontrol), dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 30°C. Bakteri yang tahan asam dapat tumbuh pada media pH 4 dan menyebabkan media menjadi keruh. Pertumbuhan bakteri pada medium ditentukan dengan adanya kekeruhan pada medium (ada partikel bakteri) juga dengan menginokulasi 10 mikroliter medium TSB tersebut keatas permukaan TSA. Apabila setelah 24 jam terdapat koloni bakteri pada bekas tetesan TSB maka bakteri tersebut hidup pada pH rendah.

Uji daya hambat (antagonis) terhadap patogen

Uji ini dilakukan dengan metode gores silang (Schelegel & Karin, 1994). Bakteri patogen yang digunakan adalah *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* GD38 dan *Vibrio harveyii* GD10. Bakteri patogen dan bakteri kandidat probiotik digoreskan secara berpotongan di atas medium TSA dan diinkubasi selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 30°C. Aktivitas antagonis ditunjukkan dengan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri patogen.

Uji resistensi terhadap antibiotik

Uji dilakukan pada medium TSA yang dicampur antibiotik oksitetrasiklin, kanamicin, ampicilin, dan atau rifampicin, masing-masing dengan dosis 5 mg/ml dengan dua ulangan. Sebanyak 20 µl bakteri dengan konsentrasi 10^5 sel/ml diteteskan di atas media TSA+antibiotik. Biakan bakteri tersebut kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Bakteri yang resisten mampu tumbuh pada medium uji sementara bakteri yang sensitif tidak mampu tumbuh.

Uji non-patogen

Uji non-patogen dilakukan pada dua isolat bakteri terpilih yang memiliki aktivitas selulolitik tertinggi, tahan asam, dan tidak bersifat resisten terhadap antibiotik, yaitu isolate JC05 dan JC20. Uji dilakukan dengan menyuntikkan bakteri berumur 24 jam dengan dosis 10^6 CFU/ikan. Setiap bakteri disuntikkan secara intraperitoneal pada 5 ekor ikan uji dengan dua ulangan. Bakteri dinyatakan non-patogen apabila tidak menyebabkan kematian ataupun gejala penyakit pada ikan uji selama pengamatan 7 hari.

Uji ketahanan hidup dalam usus ikan secara in vivo

Uji ini menggunakan nila merah yang telah dipuasakan 5 hari. Bakteri dengan kepadatan 10^4 sel/ikan dicekockkan ke dalam mulut ikan. Tiap bakteri diuji pada 6 ikan. Kemampuan bakteri untuk tumbuh dan bertahan hidup di saluran pencernaan ikan diamati dengan menghitung jumlah bakteri pada segmen usus dengan metode *Total Plate Count* (TPC) pada 2 dan 24 jam pasca

inokulasi. Sebanyak 3 ekor ikan diambil dari masing-masing perlakuan kemudian dibedah dan diambil usus anterior ±2cm dimasukkan ke dalam mikrotube steril, ditimbang dan ditambahkan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) steril sebanyak 1ml/gram sampel usus, kemudian digerus. Hasil gerusan diambil 100µl untuk diencerkan ke dalam 900µl PBS sampai pengenceran 10⁴. Selanjutnya diambil 100µl hasil pengenceran dan ditetaskan pada medium TSA untuk penghitungan jumlah koloni bakteri setelah inkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.

Identifikasi bakteri

Identifikasi secara molekuler

Identifikasi isolat bakteri JC20 dilakukan berdasarkan sekuen gen penyandi 16S r-RNA. *Primer* yang digunakan adalah *Primer F 27F* (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') dan *Primer R 1492R* (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT -3') dengan target ukuran sekuen DNA 1465 bp. Tahapan identifikasi meliputi ekstraksi DNA, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), sekuensing dan konstruksi pohon filogenetik. Genom diekstraksi menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Bakteri dikultur pada TSB dengan suhu 30°C selama 24 jam. Genom hasil ekstraksi DNA diamplifikasi *Thermalcycler* (BioRed). Proses amplifikasi terdiri dari 3 tahapan utama yaitu *denaturation*, *annealing* dan *elongation*. Siklus PCR yang digunakan yaitu pra-denaturasi (95°C, 3 menit), denaturasi (95°C, 30 detik), *annealing* (55°C, 30 detik), *elongasi* (72°C, 1 menit), *final ekstension* (72°C, 5 menit), dan *infinite hold* (12°C, sampai sampel diambil dari mesin PCR). Tahap denaturasi, annealing, dan elongasi merupakan satu siklus PCR yang diulang sebanyak 30 kali. Produk PCR kemudian divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 1% (Invitrogen) untuk mengetahui keberhasilan PCR dan ukuran DNA yang dihasilkan. Hasil PCR dilihat menggunakan *UV transilluminator* berupa pita-pita DNA yang berpendar pada *agarose*. Ukuran DNA dapat diketahui dengan menyelaraskan posisi pita tersebut dengan pita *marker* 1 kb. Hasil amplifikasi yang sesuai target kemudian disekuensing menggunakan jasa *First Base* (PT. Genetika Sains Indonesia).

Hasil sekuensing berupa dendogram yang berisi informasi mengenai urutan basa nitrogen dianalisis menggunakan aplikasi BioEdit dan dilanjutkan dengan analisis secara online menggunakan sistem BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) untuk memperkirakan jenis spesiesnya. Hasil yang diperoleh berupa sekuen beberapa spesies lain yang telah terdaftar pada *Gen Bank*, sehingga dapat diketahui spesies yang paling mirip dengan sampel dalam penelitian ini. Sekuen gen referensi diseragamkan ukurannya dengan sekuen-sekuen referensi dan disejajarkan dengan menggunakan *Clustal W Multiple Alignment* untuk membuat pohon filogenetik. Konstruksi pohon filogenetik dibuat menggunakan aplikasi perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 10.0 dengan metode *Neighbor-Joining* dan nilai bootstrap 1000.

Identifikasi secara fenotipik

Isolat bakteri JC20 dikarakterisasi secara fenotipik berdasarkan *Bergey's Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994) untuk menduga genus dari bakteri tersebut. Uji yang dilakukan meliputi uji Gram, uji katalase, uji oksidatif-fermentatif, uji motilitas, dan uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri

Total sebanyak 14 isolat bakteri selulolitik berhasil dikoleksi, yaitu 3 strain dari bandeng, 3 strain dari kakap merah utara, 5 strain dari kerapu, 2 strain dari cumi-cumi, dan 1 strain dari gurita (Tabel 1). Sebanyak 13 strain memiliki morfologi koloni berwarna krem dengan permukaan mengkilat dan memiliki diameter koloni 1-4 mm. hanya ada satu strain yang berwarna kuning mengkilat dengan ukuran koloni 3 mm.

Seleksi bakteri

Uji aktivitas selulolitik

Hasil uji aktivitas selulolitik secara kualitatif dapat dilihat pada Tabel 1. Sebanyak 14 isolat menunjukkan aktivitas selulolitik berkisar 1,1-1,8. Dua isolat dengan aktivitas selulolitik tertinggi yaitu JC05 dan JC20.

Tabel 1. Morfologi koloni dan aktivitas enzim selulolitik bakteri dari saluran pencernaan ikan laut.

| No. | Kode Isolat | Sumber | Morfologi koloni (warna, permukaan, diameter koloni (mm)) | Indeks selulolitik* |
|-----|-------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------|
| 1 | JC05 | Bandeng (<i>Chanos chanos</i>) | Krem, mengkilat, 2 | 1,8 |
| 2 | JC18 | Bandeng (<i>Chanos chanos</i>) | Krem, mengkilat, 3 | 1,6 |
| 3 | JC17 | Bandeng (<i>Chanos chanos</i>) | Krem, mengkilat, 2 | 1,1 |
| 4 | JC25 | Kakap merah Utara (<i>Lutjanus sp.</i>) | Krem, mengkilat, 2 | 1,7 |
| 5 | JC23 | Kakap merah Utara (<i>Lutjanus sp.</i>) | Krem, mengkilat, 2 | 1,5 |
| 6 | JC24 | Kakap merah Utara (<i>Lutjanus sp.</i>) | Krem, mengkilat, 1 | 1,3 |
| 7 | JC28 | Kerapu (<i>Epinephelus sp.</i>) | Krem, mengkilat, 3 | 1,7 |
| 8 | JC33 | Kerapu (<i>Epinephelus sp.</i>) | Krem, mengkilat, 2 | 1,4 |
| 9 | JC30 | Kerapu (<i>Epinephelus sp.</i>) | Krem, mengkilat, 2 | 1,4 |
| 10 | JC31 | Kerapu (<i>Epinephelus sp.</i>) | Kuning, mengkilat, 3 | 1,4 |
| 11 | JC32 | Kerapu (<i>Epinephelus sp.</i>) | Krem, mengkilat, 3 | 1,4 |
| 12 | JC10 | Cumi-cumi (<i>Loligo sp.</i>) | Krem, mengkilat, 2 | 1,6 |
| 13 | JC09 | Cumi-cumi (<i>Loligo sp.</i>) | Krem, mengkilat, 1 | 1,3 |
| 14 | JC20 | Gurita (<i>Octopus sp.</i>) | Krem, mengkilat, 2 | 1,8 |

*rerata dari dua ulangan

Uji tahan asam

Seluruh bakteri selulolitik (14 isolat) menunjukkan sifat tahan asam karena mampu tumbuh pada medium dengan pH 4. Kemampuan pertumbuhan bakteri pada medium asam tersebut sama dengan pertumbuhannya pada medium dengan pH netral.

Uji daya hambat (antagonisme) terhadap bakteri patogen

Uji antagonisme yang dilakukan terhadap 14 isolat bakteri selulolitik dalam penelitian ini menemukkan seluruh bakteri tidak memiliki kemampuan menghambat bakteri patogen yang diuji.

Uji resistensi terhadap antibiotik

Uji resistensi terhadap antibiotik menemukan 1 isolat yang memiliki sifat resistensi, yaitu isolat JC23 yang bersifat resisten terhadap ampicillin (Tabel 2). Sementara itu, sebanyak 13 isolat yang lain, termasuk didalamnya isolat JC05 dan JC20 bersifat sensitif terhadap seluruh antibiotik yang diujikan.

Tabel 2. Hasil uji resistensi bakteri terhadap antibiotik pada dosis 5 mg/ml.

| Kelompok | Kode Isolat bakteri | Respon terhadap antibiotik* | | | |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----|----|----|
| | | Ox | Km | Am | Rm |
| 1 | JC05, JC09, JC10, JC17, C18, JC20, JC24, JC25, JC28, JC30, JC31, JC32, JC33 | S | S | S | S |
| 2 | JC 23 | S | S | R | S |

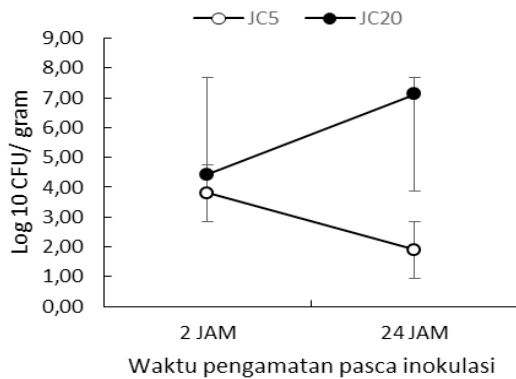
Ket. *R : Resisten, S : Sensitif, Ox: Oxytetracyclin, Km: Kanamicin, Am: Ampicilin, Rm: Rifampicin

Uji non-patogen

Ikan yang diinfeksi bakteri JC05 dan JC20 menunjukkan kondisi sehat, sama seperti kelompok kontrol negatif (ikan yang diinfeksi dengan PBS). Berdasarkan hal tersebut, isolat JC05 dan JC20 dinyatakan tidak bersifat patogen.

Uji ketahanan hidup dalam usus ikan secara in vivo

Jumlah bakteri selulolitik usus nila merah yang diinokulasi isolat JC05 mengalami penurunan pada jam ke 24, sementara pada nila merah yang diinokulasi JC20 menunjukkan jumlah yang stabil (Gambar 2). Berdasarkan hal ini, maka isolat JC20 dipilih untuk diidentifikasi secara fenotipik dan molekuler.

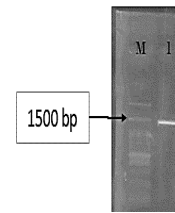


Gambar 2. Jumlah bakteri selulolitik pada saluran pencernaan nila merah pasca inokulasi bakteri JC05 dan atau JC20.

Identifikasi bakteri

Identifikasi molekuler

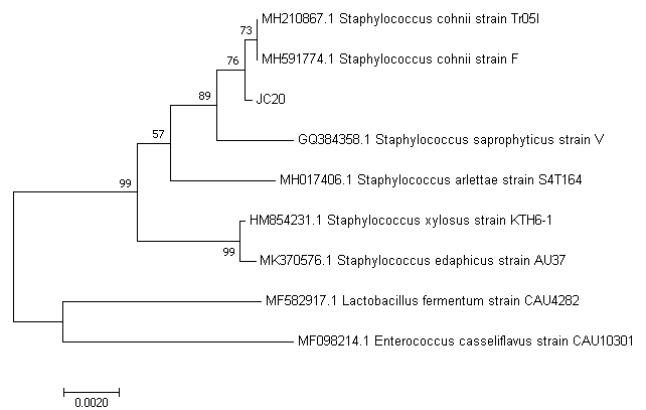
PCR gen 16S rRNA isolat JC20 menghasilkan amplicon DNA berukuran sekitar 1465 bp (Gambar 3). Analisis menggunakan program online BLAST menunjukkan bahwa isolate JC20 memiliki kemiripan paling tinggi terhadap beberapa spesies *Staphylococcus* sp. (Tabel 3). Kemiripan sebesar >99,7% hanya ditunjukkan oleh spesies *Staphylococcus* sp. Sekuen 16S rDNA isolat JC20 dan referensi dari BLAST tersebut diseragamkan ukurannya menjadi 1368 bp dan digunakan untuk konstruksi pohon filogenetik yang meletakkan isolat JC20 sebagai anggota genus *Staphylococcus* (*Staphylococcus* sp.) (Gambar 4).



Gambar 3. Pita DNA produk PCR gen 16S rRNA isolat JC20. M: Marker 1kb DNA Ladder; 1: Isolat JC20.

Tabel 3. Query coverage dan kemiripan sekuen gen 16S rRNA isolat JC20 terhadap referensi.

| Bakteri | Strain | Query coverage | Kemiripan | Accession number |
|-------------------------------------|----------|----------------|-----------|------------------|
| <i>Staphylococcus cohnii</i> | F | 100% | 99,70% | MH591774.1 |
| <i>Staphylococcus cohnii</i> | Tr051 | 100% | 99,70% | MH210867.1 |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | V | 100% | 99,41% | GQ384358.1 |
| <i>Staphylococcus arlettae</i> | S4T164 | 100% | 99,04% | MH017406.1 |
| <i>Staphylococcus xylosus</i> | KTH6-1 | 100% | 98,97% | HM854231.1 |
| <i>Staphylococcus edaphicus</i> | AU37 | 100% | 98,90% | MK370576.1 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | CAU4282 | 100% | 97,80% | MF582917.1 |
| <i>Enterococcus casseliflavus</i> | CAU10301 | 100% | 97,73% | MF098214.1 |



Gambar 4. Analisis kekerabatan isolat JC20 menggunakan metode Neighbour Joining dengan bootstrap 1000 kali.

Identifikasi secara fenotipik

Identifikasi secara fenotipik isolat JC20 digunakan untuk konfirmasi atas hasil identifikasi secara molekuler. Uji menunjukkan bahwa isolat JC20 memiliki karakter sel bersifat Gram positif, berbentuk bulat, bersifat non motil, menghasilkan enzim katalase, bersifat aerobik fakultatif, mampu memanfaatkan glukosa dan tidak mampu menggunakan laktosa dan sukrosa sebagai sumber energi (Tabel 4). Karakter fenotipik ini menegaskan bahwa isolat JC20 adalah anggota genus *Staphylococcus*.

Tabel 4. Karakter fenotipik isolat JC20, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., dan *Lactococcus* sp.

| Karakter | Isolat JC20 | <i>Staphylococcus</i> sp. (Holt et al. 1994) | <i>Streptococcus</i> sp. (Holt et al. 1994) | <i>Lactococcus</i> sp. (Holt et al. 1994) |
|---------------------|---------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Morfologi sel | kokus (bulat) | kokus (bulat) | kokus (bulat) | kokus (bulat) |
| Gram | positif | positif | positif | positif |
| motilitas | Non-motil | Non-motil | Non-motil | Non-motil |
| Katalase | + | + | - | - |
| O/F | Oksidatif dan fermentatif | Oksidatif dan fermentatif | Fermentatif | Fermentatif |
| Pemanfaatan glukosa | + | + | + | + |
| Pemanfaatan sukrosa | - | +/- | +/- | +/- |
| Pemanfaatan laktosa | - | +/- | +/- | +/- |

PEMBAHASAN

Karbohidrat diperlukan dalam diet ikan untuk menunjang kelancaran proses metabolisme protein dan lemak (Wilson, 1994). Tingkat pencernaan karbohidrat sebagai bahan pakan ikan relatif bervariasi dan sangat tergantung pada kompleksitas strukturnya. Semakin kompleks struktur karbohidrat maka semakin banyak energi yang diperlukan untuk mencerna. Sebagai contoh, pertumbuhan terbaik benih tilapia dapat dicapai dengan diet pakan yang mengandung selulosa tidak melebihi 5% (Dioundick & Stom, 1990). Sementara itu, sumber protein nabati berupa kedelai dan dedaunan saat ini digunakan sebagai alternatif substitusi pakan ikan, meskipun penggunaan bahan nabati yang tidak dapat dicerna pada ikan tersebut dapat berdampak pada terganggunya pertumbuhan. Kelangkaan enzim pemotong ikatan β -glycosida atau α -galactosida yang terdapat pada polisakarida non-pati (non-starch) seperti selulosa dan hemiselulosa pada saluran pencernaan ikan mendorong perlunya upaya perbaikan sistem pencernaan ikan melalui penggunaan enzim eksogenus agar performa pertumbuhan ikan dapat dipertahankan (Castillo & Gatlin, 2015).

Kami berhasil melakukan isolasi dan karakterisasi strain bakteri *Staphylococcus* sp. (JC20) yang memiliki aktivitas selulolitik yang kuat dan potensial sebagai kandidat probiotik ikan. Isolat tersebut diisolasi dari saluran pencernaan gurita yang bersifat carnivora dan secara umum diduga kaya enzim dan mikroba proteolitik. Isolat JC20 memiliki kemiripan tertinggi (>99,7%) terhadap *Staphylococcus* spp. Berdasarkan analisis BLAST (Altschul et al., 1990) dan fohon filogenetik yang didukung dengan kesesuaian karakter fenotipiknya. Hasil ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menemukan genus *Bacillus* sebagai kandidat penghasil selulase dari saluran pencernaan *Holotrichia parallela* (Huang et al., 2012) dan gurame (Mulyasari et al., 2015).

Kemampuan bakteri untuk hidup pada pH yang rendah atau pH asam merupakan kriteria penting dalam memilih bakteri kandidat probiotik saluran pencernaan ikan, mengingat pencernaan ikan memiliki tingkat keasaman yang tinggi (Lavanya & Dayakar, 2017). Seluruh bakteri dalam penelitian ini memiliki kemampuan untuk bertahan hidup dan tumbuh pada pH asam menunjukkan besarnya

potensi bakteri penyusun mikroflora saluran pencernaan ikan laut sebagai kandidat probiotik.

Kriteria kedua yang harus dipenuhi dalam pemilihan bakteri kandidat probiotik adalah kemampuan untuk dapat menempel dan bertahan pada dinding saluran pencernaan ikan. Semakin lama suatu probiotik mampu bertahan disaluran pencernaan ikan, maka semakin efisien penggunaannya karena tidak perlu terlalu sering dalam pemberiannya. Isolat JC20 mampu bertahan hidup di saluran pencernaan ikan dan bertahan di usus ikan minimal 24 jam pasca inokulasi. Kemampuan bertahan hidup di saluran pencernaan ini perlu dikonfirmasi lebih lanjut pada rentang waktu yang lebih lebar (mingguan).

Kriteria selanjutnya dalam pemilihan kandidat probiotik adalah tidak ada kandungan gen virulen dan resistensi antibiotik. Keberadaan gen virulen harus dihindari karena dapat menghasilkan sifat virulensi yang membahayakan ikan. Dalam penelitian ini, isolat JC20 telah diuji tidak menunjukkan tidak bersifat patogen pada nila merah sehingga diduga tidak mengandung gen virulen. Keberadaan gen resistensi antibiotik juga perlu dihindari karena beresiko pada terjadinya transfer gen ke mikroorganisme lain yang ada di lingkungan budidaya ikan yang dapat berdampak merugikan (Toomey et al., 2010; Erdiandini et al., 2015). Isolat JC20 telah diuji responnya terhadap beberapa antibiotik, yaitu oksitetrasiklin, kanamisin, ampicilin dan rifampisin. Isolat tersebut bersifat sensitif terhadap keempat antibiotik sehingga diduga tidak mengandung gen resisten terhadap antibiotik tersebut.

KESIMPULAN

Kesimpulan

Saluran pencernaan ikan laut potensial sebagai sumber kandidat probiotik ikan. *Staphylococcus* JC20 dari saluran pencernaan gurita memiliki aktivitas selulolitik yang kuat, tahan hidup pada saluran pencernaan ikan, tidak patogen dan tidak resisten terhadap antibiotik sehingga potensial sebagai kandidat probiotik ikan.

Saran

Bakteri *Staphylococcus* JC20 perlu dikarakterisasi lebih lanjut sebagai kandidat probiotik, diantaranya pada rentang waktu pertahanan hidup di saluran pencernaan ikan, konfirmasi tidak adanya gen virulen dan resistensi antibiotik, pengaruh aplikasinya terhadap mikroflora saluran pencernaan, pertumbuhan dan sistem imun ikan. Identifikasi bakteri hingga level spesies perlu dilakukan dengan DNA-DNA hibridisasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Program Hibah Penelitian Dosen Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada Tahun 2017 Nomor: 1755/PN/PT/2019 dengan tema "Pengembangan Teknologi Biokontrol untuk meningkatkan kesehatan ikan dan lingkungan" yang telah membiayai sebagian kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Altschul, S., G. Warren, W. Miller, E. Myers & D. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215 (3): 403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Balcazar, J.L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuola, D. Cunningham, D. Vendrell & J.L Muzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol*. 114: 173-186
- Castillo, S & D.M. Gatlin. 2015. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. *Aquaculture* 435: 286-292
- Davis, C. 2014. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 103: 9-17
- Dioundick, O.B & D.I. Stom. 1990. Effects of dietary a-cellulose levels on the juvenile tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture* 91: 311-315
- Erdiandini, I.T.C., Sunarti & A. Meryandini. 2015. Seleksi bakteri asam laktat dan pemanfaatannya sebagai starter kering menggunakan matriks tapioka asam. *Jurnal Sumberdaya Hayati*. 1 (1): 26-33
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*. 180: 147-165
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley & S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Ninth Edition. Williams & Wilkins. United States of America
- Huang, S., P. Sheng & H. Zhang. 2012. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *International Journals of Molecular Sciences*. 13: 2563-2577
- Irianto, A., H. Hernayanti & N. Iriyanti. 2006. Pengaruh suplementasi probiotik a3-51 terhadap derajat imunitas *oreochromis niloticus* didasarkan pada angka kuman pada ginjal setelah uji tantang dengan *aeromonas hydrophila* dan *aeromonas salmonicida achromogenes*. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*. 8 (2): 144-152
- Isnansetyo, I., I. Istiqomah, Triyanto & J. Widada. 2009. A potential bacterial biocontrol agent, strain S2V2 against pathogenic marine *Vibrio* in aquaculture. 1103-1113. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-9992-7>
- Kurniasih, T., Widanarni, Mulyasari, I. Melati, Z.I. Azwar & A.M. Lusiastuti. 2013. Isolasi, seleksi, dan identifikasi bakteri dari saluran pencernaan ikan lele sebagai kandidat probiotik. *Jurnal Riset Akuakultur*. 8 (2): 227-286
- Lavanya, K & Y. Dayakar. 2017. Isolation and characterization of probiotic bacteria from the soil samples of the coastal areas of (Gudur division, Nellore Dt.) for utilization in Shrimp farming. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 5 (4): 371-376
- Mulyasari., Widanarni, M.A. Suprayudi, M.Z. Junior & M.T.J. Sunarno. 2015. Seleksi dan identifikasi bakteri selulolitik pendegradasi daun singkong (*Manihot esculenta*) yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan gurame (*Osphronemus gouramy*). *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 10 (2): 111-121
- Schlegel G.H & S. Karin. 1994. *Mikrobiologi Umum*, Edisi Keenam. Diterjemahkan oleh Tedjo Baskoro dan Joke R. Wattimena. UGM Press. Yogyakarta
- Soeprijanto, A., G. Guntur dan M. Fakhri. 2018. Application of Probiotic and Fermented Feed in the Nursery of *Anguilla bicolor*. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*. 20 (1): 19-22. <https://doi.org/10.22146/jfs.34207>
- Tommey N., D. Bolton, & S. Fanning. 2010. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Journal Research in Microbiology*. 161: 127-135.
- Verchuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotics bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 64: 655-671
- Wilson, R.P. 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*. 124: 67-80