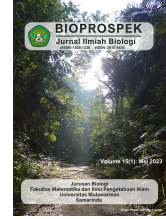




Bioprospek

<https://fmipa.unmul.ac.id/jurnal/index/Bioprospek>



DIVERSITAS DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT YANG BERPOTENSI SEBAGAI PROBIOTIK DALAM USUS IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

Helena Daten^{1*}

¹⁾Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Katolik Widya Mandira Kupang Jend. Ahmad Yani 50-52, Fax. 831194, Kupang 85225

INFO ARTIKEL

Terkirim **28 Februari 2023**
Diterima **6 Mei 2023**
Online **29 Mei 2023**

Kata kunci.
Bakteri asam laktat, indeks dominansi, probiotik, usus

ABSTRAK

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan suatu kelompok bakteri Gram positif, tidak menghasilkan spora, dan memproduksi asam laktat. Kelompok BAL banyak digunakan sebagai probiotik yang bermanfaat untuk menjaga keseimbangan mikrobiota saluran pencernaan ikan. Tujuan penelitian adalah mengetahui diversitas dan karakteristik BAL yang berpotensi sebagai probiotik. Keanekaragaman spesies BAL ditentukan dengan indeks dominansi Simpson (D). Karakteristik BAL meliputi cat Gram, katalase, toleransi terhadap garam empedu, pH, dan sensitivitas antibiotik. Diversitas BAL dalam usus ikan menunjukkan terdapat spesies yang mendominasi, dengan nilai dominansi sebesar 0,79. Indeks Nilai penting tertinggi untuk komunitas ini terdapat pada isolat C dan isolat B berturut-turut sebesar 111,80% dan 51,00%. Hal ini menunjukkan bahwa kedua spesies tersebut mempunyai peran penting dalam komunitas tersebut. Hasil cat Gram menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut merupakan kokus positif dan katalase negatif. Karakteristik BAL menunjukkan bahwa isolat A toleransi terhadap garam empedu 0,30% dan 0,50% dengan *survival rate* berturut-turut sebesar 96% dan 96,6%. Isolat B lebih toleransi terhadap garam empedu 0,50% dengan *survival rate* sebesar 95,90%, sedangkan isolat C lebih toleransi terhadap garam empedu 0,30% dengan *survival rate* sebesar 88,50%. Hasil uji toleransi pH menunjukkan isolat A, B, dan C toleransi terhadap pH 3 dengan *survival rate* berturut-turut sebesar 96,00%, 95,70%, dan 84,10%. Semua isolat resistensi terhadap antibiotik kanamycin, erythromycin, streptomycin. Berdasarkan karakteristik tersebut menunjukkan bahwa BAL dalam usus ikan mas berpotensi sebagai probiotik.

*Korespondensi: helenadaten@unwira.ac.id

1. PENDAHULUAN

Mikroba dalam usus ikan berfungsi secara kolektif sebagai organ ekstra ikan. Mikroba tersebut berkoloni memberikan perlindungan terhadap patogen dan toleransi terhadap antigen yang tidak berbahaya. Diversitas mikroba dalam saluran pencernaan lebih rendah daripada diversitas mikroba di bagian tubuh yang lain. Mikroba dalam saluran pencernaan dapat membantu pertumbuhan ikan melalui peningkatan absorpsi makanan (Haziyamin, 2012). BAL (bakteri asam laktat) adalah bakteri dengan karakteristik umumnya bentuknya batang atau kokus, Gram positif, non-sporulasi, dan katalase negatif. Selain itu, BAL juga dapat memfermentasi berbagai jenis karbohidrat untuk menghasilkan asam laktat dan asetat. Berbagai amino asam, vitamin, dan mineral sangat penting untuk pertumbuhan BAL. BAL umumnya berasosiasi dengan lingkungan yang banyak mengandung nutrisi seperti makanan, bahan yang membusuk, permukaan mukosa, saluran gastrointestinal, dan urogenital. BAL hidup normal dalam usus ikan (Muthukumar dan Kandeepan, 2015).

Usus ikan mas (*Cyprinus carpio*) merupakan inang yang banyak ditemukan berbagai jenis BAL. BAL yang umumnya ditemukan dalam usus ikan mas adalah *Enterococcus* sp. Selain itu, ditemukan BAL dominan dalam usus ikan mas adalah *Lactococcus garviae*. Beberapa BAL dapat berpotensi sebagai probiotik. Probiotik adalah mikroorganisme menguntungkan dalam bentuk tunggal atau campuran yang bila diaplikasikan pada hewan atau manusia dalam jumlah cukup akan meningkatkan kesehatan inangnya (Li *et al.*, 2012). Bakteri ini bermanfaat bagi kesehatan saluran pencernaan. Bakteri ini berperan sebagai proteksi terhadap bakteri patogen dan pengembangan sistem imun. Penggunaan probiotik juga untuk menstabilkan mikroba dalam usus, menghambat keberadaan bakteri patogen, memperbaiki keseimbangan mikroba yang mengarah pada penyerapan yang lebih baik dan tahan terhadap penyakit. Selain itu, probiotik juga dapat digunakan sebagai antibiotik. Suplementasi probiotik melalui pakan merupakan metode yang lebih baik untuk memastikan efisiensi bakteri probiotik di saluran ikan (Sivakumar *et al.*, 2015). Oleh karena itu, tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui diversitas BAL dalam usus ikan mas dan mengkarakterisasi BAL yang berpotensi sebagai probiotik.

2. METODE

A. Isolasi BAL (Bakteri Asam Laktat)

Ikan mas (*Cyprinus carpio*) dicuci dengan aquades dan dikeluarkan ususnya pada kondisi steril. Usus dihomogenasi dengan aquades dan dilakukan pengenceran dari seri pengenceran 10^{-2} – 10^{-7} . Setelah itu, disebar dengan metode *spread plate* pada media MRS (*Man Rogossa Sharp*) agar yang mengandung 1% CaCO_3 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Koloni BAL yang tumbuh ditandai dengan terbentuknya zona bening. Selanjutnya, isolat BAL yang diperoleh dimurnikan menggunakan metode *spread plate* dan koloni murni digoreskan pada agar miring untuk peremajaan. Isolat selanjutnya digunakan untuk cat Gram, uji katalase, dan karakterisasi BAL yang berpotensi sebagai probiotik (Kavitha *et al.*, 2018).

B. Uji Katalase dan Cat Gram

Hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% sebanyak 2 tetes diletakkan di gelas objek. Setelah itu, dicuplik 1 ose biakan ke atas larutan hidrogen peroksida dan dicampur merata. Reaksi dikatakan positif apabila terdapat gelembung. Bakteri Asam Laktat akan menghasilkan katalase negatif (Strelkauskasm *et al.*, 2016). Cat Gram akan menghasilkan Gram positif untuk BAL. Pengamatannya dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 400x (Strelkauskasm *et al.*, 2016).

C. Uji Toleransi pH

MRS broth dengan pH berbeda yaitu 3, 5, dan 7 dibuat menggunakan titrasi dengan HCl 1% dan NaOH 1N. Jumlah sel yang digunakan dalam perlakuan ini adalah 10^6 CFU/mL. Kultur BAL ditumbuhkan dalam media dengan variasi pH yang berbeda dan

diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 jam. Setelah itu, kultur tersebut dihitung jumlah selnya dengan metode *pour plate* (Allamesh *et al.*, 2012). Persentase pertumbuhan dihitung sesuai dengan rumus yang terdapat pada uji pH.

D. Uji Toleransi Garam Empedu

Toleransi garam empedu diuji dengan menggunakan *MRS broth* yang mengandung 0,30% dan 0,50% garam empedu *oxgall*. Jumlah sel yang digunakan dalam uji ini adalah 10⁶ CFU/mL. Kultur BAL 1 mL setiap isolat ditumbuhkan dalam media *MRS broth* 9 mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam. Setelah itu, jumlah sel dihitung pada jam setelah inkubasi (Muthukumar dan Kandeepan, 2015). Persentase pertumbuhan BAL dihitung menggunakan rumus menurut Ng Seah (2015).

$$\text{Survival rate} = \frac{\log N1}{\log N0} \times 100\%$$

Keterangan:

N0 : jumlah sel BAL sebelum perlakuan

N1 : jumlah sel BAL setelah perlakuan

E. Uji Sensitivitas Antibiotik

Cawan petri yang berisi media MRS agar dan mengandung CaCO₃ 1% dibagi menjadi empat kuadran dan diberi label antibiotik kanamycin, streptomycin, dan erithomycin untuk menandai. Kultur BAL 0,1 mL ditumbuhkan dalam media dengan metode *spread plate*. Setiap kertas cakram antibiotik diletakkan pada posisi yang sudah diberi tanda sebelumnya dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah itu, zona bening diamati di sekitar cakram antibiotik dan dihitung indeks zona hambatnya dengan rumus sesuai dengan Muthukumar dan Kandeepan (2015).

$$\text{Indeks zona hambat} = \frac{\text{diameter zona bening} - \text{diameter cakram}}{\text{diameter cakram}}$$

F. Analisis Data

Keanekaragaman spesies BAL ditentukan dengan indeks dominansi Simpson $D = \frac{\sum n(n-1)}{\sum N(N-1)}$, dimana n : jumlah individu setiap spesies, N : total jumlah individu. Indeks dominansi berkisar antara 0-1, apabila $D \leq 0,5$ maka tidak terdapat spesies yang mendominasi spesies lain dan apabila $D \geq 0,5$ maka terdapat spesies yang mendominasi (Sivakumar *et al.*, 2015).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Diversitas BAL Dalam Usus Ikan Mas

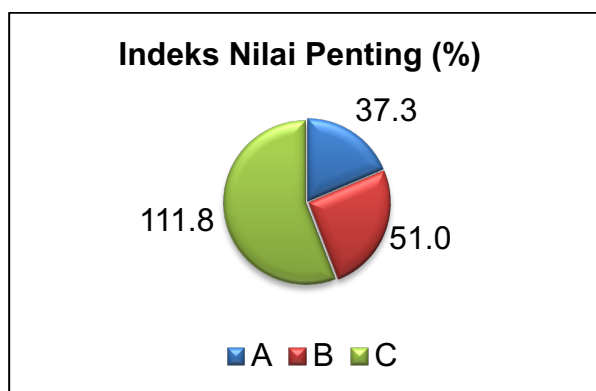
Setiap isolat memiliki koloni morfologi yang berbeda-beda. Isolat BAL A memiliki karakter morfologi bentuk koloni tidak teratur, elevasi umbonat, tekstur berkontur, pinggiran beralun, konsistensi seperti mentega dan pigmentasi krim. Jumlah koloni dalam satu populasi adalah 4 koloni. Isolat B hasil isolasi memiliki ciri morfologi adalah bentuk koloni tidak teratur, elevasi umbonat, pinggiran beralun, tekstur berkontur, konsistensi seperti mentega, pigmentasi krim dan jumlah koloni dalam populasi adalah 18 koloni. Isolat C juga memiliki ciri morfologi koloni yang berbeda yakni bentuk koloni bulat, elevasi cembung, pinggiran menyeluruh, tekstur berkontur, konsistensi seperti mentega, pigmentasi krim dan jumlah koloni dalam satu populasi adalah 80 koloni. Hasil cat Gram menunjukkan ketiga isolat tersebut adalah bentuk kokus Gram positif (Tabel 1). Hasil cat Gram menunjukkan ketiga isolat tersebut adalah bentuk kokus Gram positif (Tabel 1).

Tabel 1. Karakterisasi morfologi sel BAL

Isolat	Cat Gram	Bentuk sel	Katalase
A	Positif	Kokus	Negatif
B	Positif	Kokus	Negatif
C	Positif	Kokus	Negatif

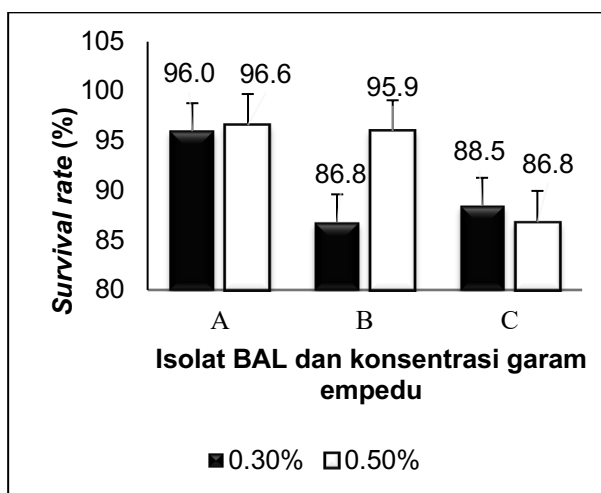
Hasil uji katalase menunjukkan ketiga isolat tersebut katalase negatif. Tujuan uji katalase adalah untuk mengetahui kemampuan aktivitas katalase oleh BAL. Kebanyakan bakteri menghasilkan enzim katalase untuk memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂. Enzim katalase penting untuk pertumbuhan aerobik karena H₂O₂ yang dibentuk dengan bantuan berbagai enzim bersifat racun terhadap sel mikroba (Haziyaamin *et al.*, 2012).

Nilai indeks dominan dari analisis populasi BAL dalam usus sebesar 0,79. Indeks dominan spesies dari populasi BAL dalam usus ikan menunjukkan terdapat spesies yang dominan. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat spesies yang mendominasi karena nilai dominansi D ≥ 0,5. Apabila nilai mendekati 1 maka semakin kompleks BAL tersebut yang mendominasi. Spesies yang mendominasi tersebut adalah isolat C. INP (Indeks Nilai Penting) dalam analisis keanekaragaman sangat penting, karena bertujuan untuk mengetahui seberapa penting peran dari BAL tersebut di dalam komunitasnya (Sivakumar *et al.*, 2015). Nilai INP terbesar terdapat pada isolat C sebesar 111,80%. Nilai INP terbesar kedua ditunjukkan oleh isolat B sebesar 51%, dan nilai INP terkecil terdapat pada isolat A yakni 37,30% (Gambar 1).



Gambar 1. Indeks nilai penting dari keanekaragaman isolat BAL dari usus ikan mas

B. Toleransi Garam Empedu



Gambar 2. Survival rate sel BAL pada konsentrasi garam empedu 0,3% dan 0,5%

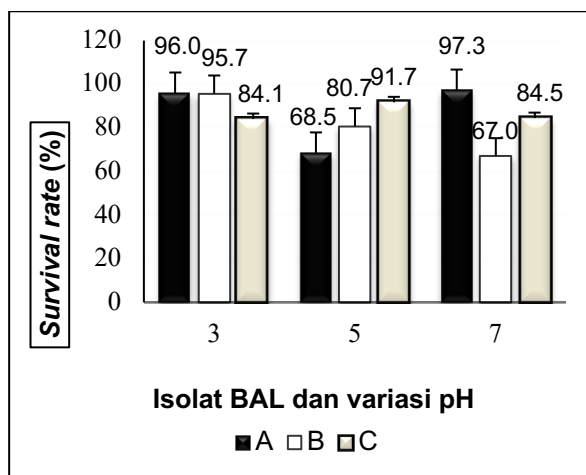
Setiap BAL memiliki toleransi garam empedu berbeda-beda. Isolat A lebih toleransi terhadap kadar garam empedu 0,50% dengan persentase pertumbuhan sel BAL sebesar

96,60%. Isolat B toleransi terhadap kadar garam empedu 0,50% dengan persentase pertumbuhan sebesar 95,90%. Isolat C lebih toleransi terhadap garam empedu 0,30% dengan persentase pertumbuhan sebesar 88,50% (Gambar 2).

Toleransi terhadap garam empedu merupakan salah satu syarat bakteri probiotik untuk tumbuh dan survive dalam usus ikan (Muthukumar dan Kandeepan, 2015). Probiotik dapat toleransi terhadap pH rendah dan garam empedu tidak hanya bertujuan agar BAL dapat lolos dari lambung dan aktif dalam usus tetapi juga bertujuan agar BAL tersebut bisa hidup dan bertahan pada kondisi stress.

C. Toleransi Terhadap pH

Berdasarkan hasil pengamatan, aktivitas isolat A, B, dan C terlihat pada pH 3,5, dan 7. Persentase pertumbuhan isolat A paling tinggi adalah pada pH 7, persentase pertumbuhan isolat B paling tinggi adalah pada pH 3, persentase pertumbuhan isolat C paling tinggi adalah pada pH 5. Persentase pertumbuhan bakteri (Gambar 3) menunjukkan bahwa semua isolat dapat bertahan dalam kondisi pH asam (3 dan 5). Hal ini menunjukkan bahwa perubahan pH mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan pada pH asam cukup tinggi sehingga dapat dikatakan bahwa ketiga isolat tahan terhadap suasana asam dan dapat berpotensi sebagai antibiotik.



Gambar 3. Survival rate isolat BAL pada Ph 3, 5, dan 7

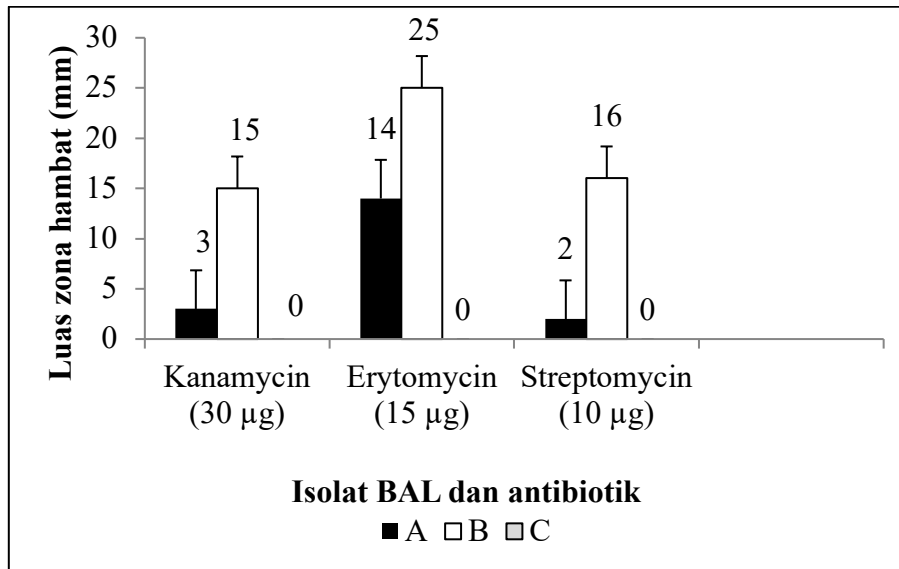
Salah satu kriteria penting dalam organisme probiotik adalah memiliki kemampuan bertahan hidup pada pH rendah. Kemampuan bertahan hidup dan tumbuh pada pH rendah memungkinkan isolat untuk dapat tetap tinggal dan fungsional dalam pencernaan, sehingga kemungkinan juga berpotensi sebagai probiotik. Pada pH 7, aktivitas bakteri asam laktat lebih tinggi dibandingkan dengan pH lainnya (Allamesh *et al.*, 2012).

D. Sensitivitas Terhadap Antibiotik

Hasil uji sensitivitas antibiotik menunjukkan bahwa isolat C resisten terhadap semua antibiotik (kanamycin, erythromycin, dan streptomycin) karena tidak membentuk zona hambat (0 mm). Isolat A memiliki luas zona hambat berturut-turut untuk antibiotik kanamycin, erythromycin, dan streptomycin adalah 3 mm, 14 mm, dan 2 mm. Isolat B menghasilkan zona hambat kanamycin sebesar 15 mm, erythromycin sebesar 25 mm, dan streptomycin sebesar 16 mm (Gambar 4). Berdasarkan hasil yang diperoleh, maka isolat A tidak resisten sepenuhnya terhadap antibiotik erythomycin tetapi resisten terhadap kanamycin dan streptomycin. Selain itu, hasil penelitian menunjukan bahwa isolat B sensitif terhadap erythomycin dan tidak resisten sepenuhnya terhadap kanamycin dan streptomycin.

Resistensi yang rendah merupakan sifat positif yang dimiliki probiotik. Resistensi pada antibodi spesifik menunjukkan bahwa probiotik dapat digunakan bersama-sama dengan

treatment antibiotik yang diberikan (Cebeci dan Gurakan, 2003; Kim dan Austin, 2008). Bakteri dikatakan resisten terhadap antibiotik kanamycin (ka) apabila diameter zona beningnya ≤ 13 mm, intermediet apabila diameternya 14-17 mm, dan sensitif apabila diameternya ≥ 18 mm. Bakteri dikatakan resisten terhadap antibiotik erythromycin (er) apabila diameter zona beningnya ≤ 13 mm, intermediet apabila diameternya 14-22 mm, dan sensitif apabila diameternya ≥ 23 mm. Bakteri dikatakan resisten terhadap antibiotik streptomycin (str) apabila diameter zona beningnya ≤ 14 mm, intermediet apabila diameternya 15-20 mm, dan sensitif apabila diameternya ≥ 21 mm. (Bauer *et al.*, 1966).



Gambar 4. Sensitifitas BAL terhadap antibiotik kanamycin, erythromycin, dan streptomycin

4. KESIMPULAN

Spesies BAL yang mendominasi di dalam usus ikan mas adalah isolat C dengan nilai dominansi sebesar 0,79. Ketiga isolat BAL toleransi terhadap garam empedu dan pH rendah. Isolat yang memenuhi syarat probiotik adalah isolat B karena toleransi terhadap kondisi lingkungan usus ikan mas dan sensitif terhadap erythromycin serta tidak resisten sepenuhnya terhadap kanamycin dan streptomycin. Saran untuk penelitian selanjutnya adalah isolat B perlu dilakukan uji lanjut untuk mengetahui potensinya dalam menghambat bakteri patogen yang menyebabkan penyakit pada ikan mas.

DAFTAR PUSTAKA

- Allamesh SK, Daud H, Mohammad YF, Che RS, Aini I. (2012). Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*). *Afr. J. Biotechnol.* 11(16): 3810-3816.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
- Cebeci A dan Gurakan C. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiol.* 20(20): 511-518.
- Haziyaamin T, Tengku AH, Ahmed JK, Muhammad FJ, Nur SS. (2012). Isolation and screening of lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* from *Clarias gariepinus* (African catfish) with potential use as probiotic in aquaculture. *African Journal of Biotechnology* 11(29): 7494-7499.
- Kavitha M, Raja M, Perumal P. (2018). Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* spp. isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu*. *Aquaculture Reports* 11: 59-69.
- Kim DH dan Austin B. (2008). Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Let. Appl. Microbiol* 47(3): 141-147.

- Li X, Qingyun Y, Shouqi X, Wei H, Yuhe Y, Zihua H. (2012). Gut microbiota contributes to the growth of fast-growing transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *PLoS ONE* 8(5): 1-11.
- Muthukumar P dan Kandeepan C. (2015). Isolation, identification and characterization of probiotic organisms from intestine of fresh water fishes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4(3): 607-616.
- Ng Seah Y. (2015). Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria from traditional Malaysian fermented Bambang (*Mangifera pajang*). *Journal of Food* 13(4): 563-572.
- Sivakumar K, Janani D, Shree RM. (2015). Analysis of microbial biodiversity in intestine of ornamental fishes gut. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 2(6): 232-234.
- Strelkauskasm A, Angela E, Beatrix F, Greg P, Jennifer S. (2016). *Microbiology: A Clinical Approach*. Garland Science. Washington.