

**Penapisan bakteri probiotik dari saluran pencernaan dan media pemeliharaan ikan jelawat (*Leptobarbus hoeveni* Bleker) untuk pengendalian bakteri patogen**

**Screening of probiotic bacteria from intestine and culture environment of hoeven's slender carp (*Leptobarbus hoeveni* Bleker) to control pathogenic bacteria**

**Sunarto<sup>1\*</sup>, Sukenda<sup>2</sup>, Widanarni<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Univ. Muhammadiyah Pontianak Jln. A. Yani No. 111  
Telp/Fax. (0561) 764571/737278.

<sup>2</sup>. Departemen Budidaya Perairan, FPIK, Institut Pertanian Bogor.  
\*Email: sunarto\_ump@yahoo.co.id

**ABSTRACT**

The ability of probiotic bacteria to control disease infection has been used in aquaculture. This experiment was conducted to isolate and characterize probiotic bacteria; the competition tests its ability probiotic bacteria against pathogenic bacteria; and to improve survival of *Leptobarbus hoeveni*. The bacteria were isolated from *Leptobarbus hoeveni* and its culture environment, and then tested to know its ability to inhibit bacterial fish pathogen *in vitro*. Furthermore, the selected probiotic bacteria were tested *in vivo* to evaluate their ability to inhibit pathogen of *Leptobarbus hoeveni*. The result showed that probiotic bacteria inhibited the growth of *Streptococcus iniae*, *Flexibacter columnaris*, *Mycobacterium fortuitum* and *Aeromonas hydrophila in vitro*. Isolate DD3 was the best of candidate probiotic because of the ability to inhibit pathogen, especially *A. hydrophila*, the most virulent bacteria in *Leptobarbus hoeveni*.

Keywords: probiotic bacteria, *Leptobarbus hoeveni*, pathogenic bacteria.

**ABSTRAK**

Kemampuan bakteri probiotik untuk mengendalikan penyakit infeksi telah digunakan dalam akuakultur. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri probiotik, menguji kemampuan bakteri probiotik terhadap bakteri patogen, sehingga dapat meningkatkan kelangsungan hidup ikan jelawat (*Leptobarbus hoeveni*). Bakteri diisolasi dari usus ikan jelawat dan lingkungan budaya, kemudian diuji kemampuannya menghambat bakteri patogen secara *in-vitro*. Selanjutnya bakteri probiotik yang dipilih diuji secara *in vivo* untuk mengevaluasi kemampuannya dalam menghambat patogen di dalam tubuh ikan jelawat. Dari hasil penelitian diperoleh bakteri probiotik yang diisolasi dari usus dan lingkungan budaya ikan jelawat menunjukkan penghambatan pertumbuhan terhadap *Streptococcus iniae*, *Flexibacter columnaris*, *Mycobacterium fortuitum* dan *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*. Isolat DD3 merupakan kandidat probiotik terbaik, karena mempunyai kemampuan untuk menghambat bakteri patogen, khususnya bakteri *A. hydrophila* adalah bakteri yang paling viluren bagi ikan jelawat.

Kata kunci: bakteri probiotik, ikan jelawat, bakteri patogen.

**PENDAHULUAN**

Ikan jelawat (*Leptobarbus hoeveni*) pada awalnya adalah ikan liar yang hidup di perairan sungai di Kalimantan Barat yang telah didomestikasikan, dan saat ini telah berhasil dibudidayakan. Salah satu kendala dalam budidaya ikan jelawat adalah sifat ikan yang mudah mengalami stres, dan tingginya mortalitas selama periode

budidaya. Salah satu penyebab dari tingginya mortalitas tersebut diduga sebagai akibat infeksi penyakit. Namun demikian, patogen penyebab infeksi penyakit yang menyerang ikan jelawat hingga saat ini belum diketahui secara pasti. Karena itu, di dalam penelitian ini digunakan beberapa jenis bakteri patogen yang sering menginfeksi ikan air tawar, seperti *Streptococcus iniae*, *Flexibacter columnaris*,

*Mycobacterium fortuitum*, dan *Aeromonas hydrophila*, sebagai langkah awal untuk menguji kerentanan ikan jelawat terhadap beberapa bakteri patogen.

Upaya yang dapat dilakukan dalam mengendalikan infeksi penyakit adalah dengan pencegahan berupa pemberian vaksin, dan/atau imunostimulan, sedangkan tindakan pengobatan dapat dilakukan dengan menggunakan bahan kimia, dan antibiotik. Selain itu, dapat pula dilakukan upaya pencegahan dengan menggunakan probiotik. Gatesoupe (1999) menyatakan bahwa penggunaan probiotik dapat dikategorikan sebagai pengendalian biologis (*biocontrol*), karena perannya dalam membasmi atau membunuh organisme penyebab penyakit. Mekanisme kerja dari bakteri probiotik dalam mengontrol bakteri patogen adalah dengan menghasilkan senyawa antimikroba atau dengan kompetisi seperti kompetisi senyawa kimia atau ketersediaan energi dan kompetisi tempat penempelan (Verschuere *et al.*, 2000).

Kajian mengenai bakteri probiotik sudah cukup banyak dilakukan. Beberapa bakteri yang ditemukan di usus ikan air tawar mempunyai kemampuan antibakterial terhadap beberapa strain bakteri patogen (Sugita *et al.*, 1996). Muliani *et al.* (2003) dan Widanarni (2004) memperoleh isolat bakteri *Vibrio* dari tambak dan air laut yang mampu menekan serangan bakteri *Vibrio harveyi* penyebab penyakit vibriosis pada udang, sehingga kelangsungan hidup udang meningkat.

Bakteri probiotik harus memiliki sifat-sifat penting, di antaranya bakteri tidak merugikan inang tempat kolonisasi, bakteri diterima oleh inang melalui ingesti dan kolonisasi potensial serta replikasi di dalam tubuh inang dan mencapai lokasi di mana pengaruh diperlukan. Oleh sebab itu bakteri probiotik dapat bersifat spesifik untuk inang atau sistem budidaya ikan tersebut. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi, mengkarakterisasi, dan menguji kemampuan penghambatan bakteri probiotik terhadap bakteri patogen untuk meningkatkan kelangsungan hidup ikan jelawat.

## BAHAN DAN METODE

### Isolasi dan pemurnian bakteri probiotik

Bakteri diisolasi dari 10 ekor ikan jelawat, dan media pemeliharaannya. Pengambilan isi saluran pencernaan ikan jelawat sebagai sumber inokulum dilakukan dengan cara mengeluarkan saluran pencernaan ikan jelawat yang telah dimatikan. Saluran pencernaan ditimbang sebanyak 1 g, kemudian digerus menggunakan mortar dan diencerkan 10% dengan larutan fisiologis (NaCl 0,85%) steril. Sampel air diambil 0,1 ml dan ditambah larutan fisiologis 0,9 ml. Kemudian disebar di media TSA dan diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam. Koloni yang tumbuh dan berbeda secara morfologi diisolasi dan dikultur kembali pada media TSA sampai ditemukan koloni murni. Koloni murni selanjutnya disimpan dalam agar miring untuk digunakan dalam pengujian selanjutnya.

### Uji penghambatan bakteri probiotik terhadap beberapa bakteri patogen secara *in vitro*

Bakteri hasil isolasi diuji kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen secara *in vitro* dengan metode Kirby-Bauer (Lay, 1994). Isolat bakteri patogen dan kandidat bakteri probiotik berumur 24 jam diencerkan hingga memiliki konsentrasi sama ( $10^6$  cfu/ml). Suspensi bakteri patogen (*Streptococcus iniae*, *Flexibacter columnaris*, *Mycobacterium fortuitum*, dan *Aeromonas hydrophila*) masing-masing disebar pada media TSA sebanyak 50  $\mu$ l, kertas cakram dengan diameter 6 mm direndam dalam suspensi bakteri probiotik dan dikering anginkan. Kemudian kertas cakram ditempatkan di atas media TSA yang telah disebari bakteri patogen selanjutnya diinkubasikan pada suhu ruang selama 24-48 jam. Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan penggaris pada 3 posisi dari setiap kertas cakram, kemudian dirataratakan.

Isolat yang menghasilkan zona bening berarti menunjukkan kemampuan menghambat bakteri patogen. Empat bakteri probiotik dengan zona hambat terluas dari

masing-masing bakteri patogen dipilih untuk uji selanjutnya.

#### **Uji patogenisitas bakteri probiotik pada ikan jelawat**

Bakteri probiotik dengan zona hambat terluas diuji patogenisitasnya pada ikan jelawat. Ikan jelawat diinjeksi bakteri probiotik terpilih hasil penelitian sebelumnya dengan konsentrasi  $10^6$  cfu/ekor serta larutan fisiologis sebagai kontrol 0,1 ml/ekor secara intramuskular. Pada setiap perlakuan dan kontrol, ikan jelawat dipelihara sebanyak 10 ekor/akuarium dengan 3 ulangan. Pengamatan kelangsungan hidup ikan jelawat pasca injeksi dengan bakteri probiotik dilakukan selama 10 hari, ikan yang mati dihitung setiap hari dan dibandingkan dengan kontrol negatif.

#### **Uji kerentanan ikan jelawat terhadap beberapa bakteri patogen**

Uji kerentanan dilakukan untuk mengetahui bakteri patogen yang paling virulen dan dapat menyebabkan kematian pada ikan jelawat. Bakteri patogen yang digunakan adalah *S. iniae*, *F. columnaris*, *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* yang berasal dari isolat murni. Penentuan uji kerentanan dilakukan dengan cara menginjeksikan masing-masing bakteri patogen pada ikan jelawat dengan konsentrasi  $10^6$  cfu/ml sebanyak 0,1 ml/ekor secara intramuskular, sehingga didapatkan bakteri yang paling virulen untuk digunakan pada uji *in vivo*.

#### **Uji penghambatan bakteri probiotik terhadap *A. hydrophila* dalam tubuh ikan**

Isolat bakteri probiotik yang kemampuannya potensial dan tidak bersifat patogen diuji dalam menghambat infeksi bakteri patogen pada ikan jelawat. Ikan diinjeksi intramuskular dengan bakteri probiotik, selanjutnya pada hari ke tiga pasca penginjeksian bakteri probiotik, ikan diuji tantang dengan bakteri patogen *A. hydrophila* dengan konsentrasi  $10^6$  cfu/ekor.

Pada pengujian ini disertakan perlakuan kontrol positif (penginfeksi dengan *A. hydrophila*) dan kontrol negatif (penginjeksian dengan larutan fisiologis) sebagai

pembandingan perlakuan. Parameter yang diamati dalam uji tantang ini adalah:

#### **Populasi bakteri patogen**

Pengamatan populasi bakteri *A. hydrophila* pada ginjal dan hati ikan jelawat dilakukan setiap 6 jam. Populasi bakteri yang diperoleh dibandingkan dengan kontrol. Populasi bakteri dihitung berdasarkan rerata jumlah koloni yang tumbuh dan dikalikan dengan faktor pengenceran.

#### **Identifikasi bakteri secara molekuler**

Identifikasi isolat bakteri yang memberikan tingkat patogenisitas tertinggi dilakukan berdasarkan hasil sekuensing gen 16S-rRNA (Marchesi, 1998). Sekuensing gen 16S-rRNA terdiri dari tahapan ekstraksi DNA, amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR, *gene clean* menggunakan *Gel/PCR DNA Fragments Extraction KIT* Geneaid dan sekuensing dengan mesin sekuenser.

#### **Analisis statistik**

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap yang terdiri dari lima perlakuan dan tiga ulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis sidik ragam pada tingkat kepercayaan 95% dan dilanjutkan dengan uji Duncan untuk melihat pengaruh antar perlakuan terhadap masing-masing peubah yang diamati (Mattjik & Sumertajaya, 2000).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Isolasi bakteri probiotik**

Bakteri yang berhasil diisolasi dari usus ikan jelawat dan media pemeliharaan sebanyak 40 isolat dengan rincian yang berasal dari saluran pencernaan berjumlah 28 isolat dan media pemeliharaan berjumlah 12 isolat. Berdasarkan ciri-ciri morfologi diperoleh adanya kesamaan antara beberapa isolat yang berasal dari saluran pencernaan dan media pemeliharaan ikan jelawat. Morfologi koloni isolat pada media TSA berwarna putih, krem, transparan, kuning dan kuning krem dengan bentuk bulat, tak beraturan, menyebar, membulat dan menyebar tidak rata.

### Penghambatan bakteri probiotik terhadap beberapa bakteri patogen secara *in vitro*

Zona hambat disekitar koloni atau pertumbuhan bakteri patogen menunjukkan bahwa bahan antimikrobia yang dihasilkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Kepekaan bakteri patogen terhadap bahan antimikrobia ditunjukkan oleh luasnya zona hambat sekitar pertumbuhan bakteri patogen.

Isolat DM1 mempunyai zona hambat paling besar dalam berkompetisi dengan bakteri *S. iniae* (12,0 mm), isolat DDD1 mempunyai zona hambat terluas dalam berkompetisi dengan bakteri *F. columnaris* (11,0 mm), isolat DS3 mempunyai zona hambat terbesar dalam berkompetisi dengan bakteri *M. fortuitum* (11,0 mm) dan isolat DD3 mempunyai zona hambat terbesar dalam berkompetisi dengan bakteri *A. hydrophila* (9,0 mm) (Tabel 1). Empat isolat dengan zona hambat terluas dipilih untuk pengujian selanjutnya.

Pelczar dan Chan (1988) menyatakan nilai-nilai zona hambat yang berbeda dapat dipengaruhi beberapa faktor dan keadaan yang mempengaruhi efek antimikrobia. Hal tersebut sesuai dengan pengamatan yang dilakukan, karena dengan konsentrasi dan bakteri probiotik yang sama digunakan untuk penghambatan bakteri patogen berbeda menghasilkan diameter zona hambat yang berbeda. Menurut Atlas dan Richard (1993) luasnya zona hambat merupakan petunjuk kepekaan mikroorganisme terhadap antibakteri.

### Patogenisitas bakteri probiotik pada ikan jelawat

Patogenisitas bakteri DM1, DDD1, DD3 dan DS3 terhadap ikan jelawat perlu diketahui sebelum digunakan sebagai probiotik. Patogenisitasnya diketahui dari tingkat kelangsungan hidup ikan jelawat yang diinfeksi dengan keempat isolat bakteri tersebut. Masing-masing hasil pengujian membuktikan bahwa semua isolat tidak bersifat patogen dengan tingkat kelangsungan hidup ikan jelawat 100% untuk semua isolat. Begitu pula dengan kontrol negatif kelangsungan hidup ikan jelawat 100%.

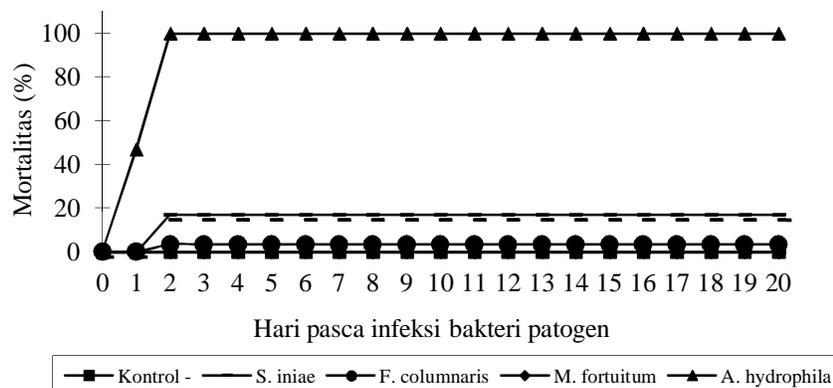
Verschuere *et al.* (2000) menyatakan bahwa probiotik merupakan agen mikroba hidup yang memberikan pengaruh menguntungkan pada inang, dengan demikian bakteri probiotik itu tidak boleh bersifat patogen terhadap inang, baik dalam kondisi normal maupun stres. Berdasarkan hal ini, maka keempat isolat tersebut aman digunakan dan diharapkan dapat menekan perkembangan bakteri patogen.

### Kerentanan ikan jelawat terhadap beberapa bakteri patogen

Berdasarkan hasil uji kerentanan diperoleh tiga bakteri patogen dengan konsentrasi  $10^6$  cfu/ml yang menyebabkan kematian ikan uji dan bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri yang paling virulen pada ikan jelawat (Gambar 1). Hasil uji kerentanan ikan jelawat terhadap bakteri patogen dengan konsentrasi  $10^6$  cfu/ml pada *S. iniae* mortalitas sebesar 16,67% pasca infeksi bakteri *S. iniae*, tubuh ikan jelawat pada bagian yang diinfeksi mengalami peradangan kecil berwarna hitam.

Tabel 1. Luas zona hambat yang dihasilkan dalam uji *in vitro*.

No	Kode Isolat	Zona Hambat (mm)			
		<i>S. iniae</i>	<i>F. columnaris</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>A. hydrophila</i>
1	DM1	12,0	7,0	7,0	7,0
2	DDD1	7,0	11,0	7,0	6,0
3	DS3	6,0	7,0	11,0	7,0
4	DD3	7,0	7,0	8,0	9,0



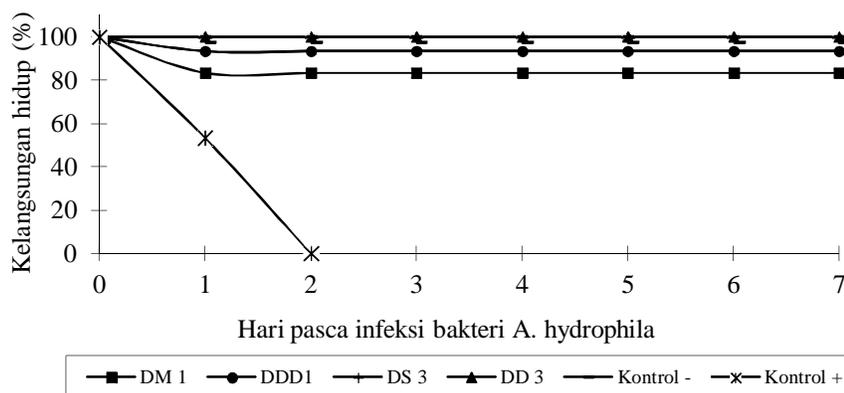
Gambar 1. Mortalitas ikan jelawat pada uji kerentanan terhadap beberapa jenis bakteri patogen.

Mortalitas ikan uji pasca infeksi *F. columnaris* sebesar 3,33%, mortalitas pasca infeksi *M. fortuitum* sebesar 0%, sedangkan mortalitas pasca infeksi *A. hydrophila* sebesar 100% pada hari ke-2 dengan ciri-ciri hampir seluruh tubuh mengalami peradangan sehingga tubuh berwarna merah. Hasil pengujian kerentanan, antara infeksi *A. hydrophila* dengan semua perlakuan memberikan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ), sedangkan antar perlakuan infeksi bakteri *S. iniae*, *F. columnaris* dan *M. fortuitum* tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ).

#### Penghambatan bakteri probiotik terhadap *Aeromonas hydrophila* dalam tubuh ikan

Tingkat kelangsungan hidup ikan jelawat setelah uji tantangan dengan bakteri *A. hydrophila* diamati hingga hari ke-7. Pemberian bakteri probiotik melalui injeksi

memberikan pengaruh yang nyata terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan jelawat yang diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* ( $p < 0,05$ ). Pada pemberian bakteri probiotik DM1 menghasilkan kelangsungan hidup 83,33%, DDD1 sebesar 93,33%, DS3 sebesar 93,33%, DD3 sebesar 100%, dan pada kontrol negatif memberikan kelangsungan hidup 100%, sedangkan pada kontrol positif kelangsungan hidupnya 0% (Gambar 2). Berdasarkan hasil uji, antara perlakuan DM1 dengan semua perlakuan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ), sedangkan antara perlakuan DDD1 dan DS3 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ) dan perlakuan DD3 berbeda dengan semua perlakuan. Hal ini membuktikan bahwa kandidat bakteri probiotik DD3 mampu menghambat infeksi bakteri *A. hydrophila* dengan baik, sehingga memberikan kelangsungan hidup 100%.



Gambar 2. Kelangsungan hidup ikan jelawat pada uji *in vivo*.

Gejala klinis yang muncul pasca uji tantang dengan *A. hydrophila* pada ikan yang sebelumnya diberi probiotik DD3 dan kontrol positif tanpa probiotik ditampilkan dalam Gambar 3. Ikan uji dengan pemberian probiotik DD3 tampak sehat, warna cerah dan tubuhnya tidak terdapat kelainan, sedangkan pada ikan uji kontrol positif ikan uji mengalami dropsi dan peradangan serta sisik rontok sehingga berwarna kemerahan pada tubuhnya akibat infeksi *Aeromonas hydrophila*.

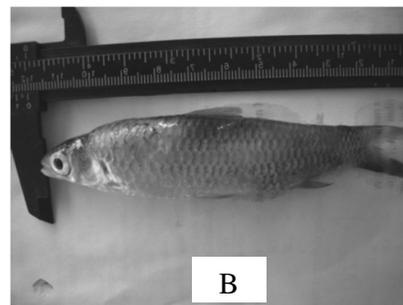
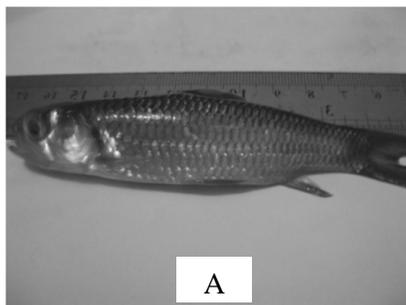
### Populasi bakteri *A. hydrophila*

Kemampuan bakteri dalam menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* pada ikan jelawat dilihat dengan menghitung populasi *A. hydrophila* setiap 6 jam. Pengamatan populasi bakteri dimulai pada jam ke-1, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan terakhir pada jam ke-48, pengamatan dilakukan pada ginjal dan hati ikan jelawat (Gambar 4, dan Gambar 5).

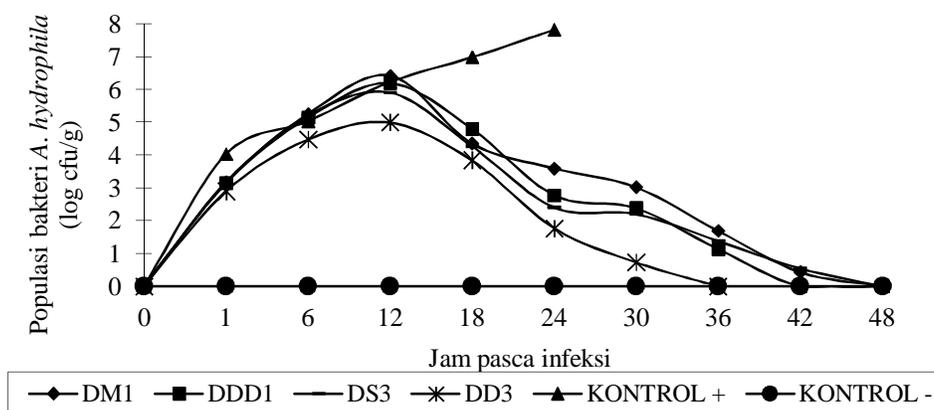
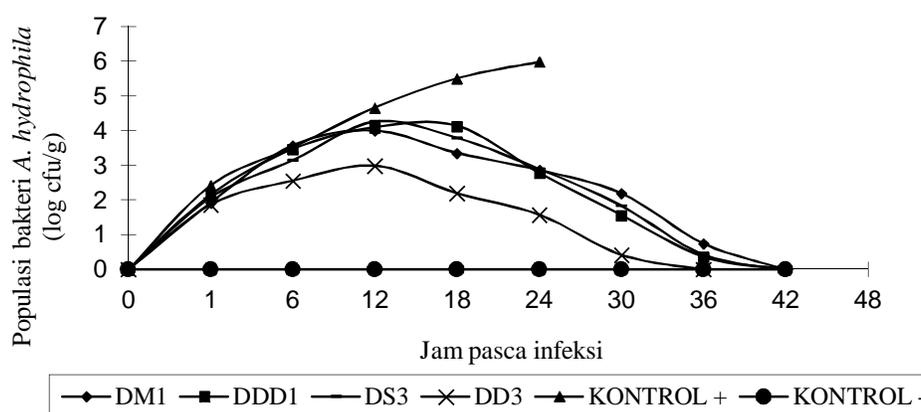
Pemberian isolat bakteri melalui injeksi memberikan pengaruh yang nyata terhadap penurunan populasi *A. hydrophila* pada ginjal ikan jelawat ( $p < 0,05$ ). Populasi *A. hydrophila* yang diisolasi dari ginjal ikan jelawat setelah uji tantang mengalami penurunan yakni mulai jam ke-18 sampai jam ke-42, kisaran populasi *A. hydrophila* pada ginjal ikan selama pengamatan adalah  $1,22 \times 10^1$  s.d  $8,70 \times 10^6$  cfu/g. Pada perlakuan DM1 pada jam ke-1 pasca infeksi dengan rata-rata populasi *A. hydrophila* pada ginjal ikan jelawat sebanyak  $3,17 \times 10^3$  cfu/g, populasi tertinggi ditemukan pada jam ke-12 dengan populasi sebesar  $6,42 \times 10^6$  cfu/g. Selanjutnya mengalami penurunan

pada jam ke-18 hingga jam ke-42. Perlakuan DDD1 populasi *A. hydrophila* juga mulai terlihat pada jam ke-1 pasca infeksi sebanyak  $3,14 \times 10^3$  cfu/g. Populasi tertinggi *A. hydrophila* ditemukan pada jam ke-12 pasca infeksi dengan populasi sebesar  $6,19 \times 10^6$  cfu/g, kemudian menurun pada jam ke-18 hingga jam ke-36. Pada perlakuan DS3 populasi *A. hydrophila* juga mulai terlihat pada jam ke-1 pasca infeksi sebesar  $3,16 \times 10^3$  cfu/g dan puncaknya pada jam ke-12 sebesar  $5,90 \times 10^5$  cfu/g. Kemudian menurun mulai jam ke-18 hingga jam ke-42. Pada perlakuan DD3 populasi *A. hydrophila* mulai terlihat pada jam ke-1 pasca infeksi sebesar  $2,89 \times 10^2$  cfu/g dengan populasi tertinggi pada jam ke-12 sebesar  $4,98 \times 10^4$  cfu/g dan penurunan populasi hingga jam ke-30 pasca infeksi. Sedangkan pada kontrol positif populasi *A. hydrophila* pada jam ke-1 sebesar  $4,02 \times 10^4$  cfu/g dan meningkat terus hingga jam ke-24 pasca infeksi sebesar  $7,81 \times 10^7$  cfu/g.

Berdasarkan hasil analisis ragam, jam ke-1 dan ke-6 populasi bakteri *A. hydrophila* pada ginjal ikan antar perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ). Selanjutnya mulai jam ke-12 populasi bakteri *A. hydrophila* antara perlakuan DD3 dengan perlakuan lainnya memberikan perbedaan yang nyata hingga jam ke-36. Mulai jam ke-42 pada perlakuan DM1, DDD1, DS3 dan DD3 tidak ditemukan lagi bakteri *A. hydrophila* pada ginjal ikan, sedangkan pada kontrol positif semua ikan uji telah mengalami kematian pada jam ke-24 pasca infeksi *A. hydrophila*.



Gambar 3. Gejala klinis pasca infeksi *A. hydrophila* pada (A) ikan uji perlakuan DD3 kondisi tubuh sehat tanpa cacat dengan warna cerah kehijauan, dan (B) ikan uji kontrol positif dengan kondisi tubuh dropsi, mengalami peradangan dengan warna kemerahan.

Gambar 4. Populasi bakteri *Aeromonas hydrophila* (log cfu/g) pada ginjal ikan jelawat.Gambar 5. Populasi bakteri *Aeromonas hydrophila* (log cfu/g) pada hati ikan jelawat.

Populasi bakteri *A. hydrophila* yang ditemukan di hati ikan jelawat setelah uji tantang juga mengalami penurunan pada jam ke-18 sampai jam ke-48, kisaran populasi *A. hydrophila* dalam hati ikan selama pengamatan adalah  $1,05 \times 10^1$  s.d  $2,62 \times 10^5$  cfu/g. Pada perlakuan DM1 pada jam ke-1 pasca infeksi dengan rerata populasi *A. hydrophila* pada hati ikan jelawat sebanyak  $1,92 \times 10^1$  cfu/g dengan populasi tertinggi ditemukan pada jam ke-12 sebesar  $3,99 \times 10^3$  cfu/g. Selanjutnya mengalami penurunan pada jam ke-18 hingga jam ke-42. Perlakuan DDD1 populasi *A. hydrophila* juga mulai terlihat pada jam ke-1 pasca infeksi sebanyak  $2,14 \times 10^2$  cfu/g. Populasi tertinggi *A. hydrophila* ditemukan pada jam ke-12 pasca infeksi dengan populasi sebesar  $4,09 \times 10^4$  cfu/g, kemudian menurun pada jam ke-18 hingga jam ke-36. Pada perlakuan

DS3 populasi *A. hydrophila* juga mulai terlihat pada jam ke-1 pasca infeksi sebesar  $2,07 \times 10^2$  cfu/g dan puncaknya pada jam ke-12 sebesar  $4,25 \times 10^4$  cfu/g. Kemudian menurun pada jam ke-18 hingga jam ke-42. Pada perlakuan DD3 populasi *A. hydrophila* mulai terlihat pada jam ke-1 pasca infeksi sebesar  $1,87 \times 10^1$  cfu/g dengan populasi tertinggi pada jam ke-12 sebesar  $2,98 \times 10^2$  cfu/g dan penurunan populasi hingga jam ke-30 pasca infeksi. Sedangkan pada kontrol positif populasi *A. hydrophila* pada jam ke-1 sebesar  $2,42 \times 10^2$  cfu/g dan meningkat terus hingga jam ke-24 pasca infeksi sebesar  $5,97 \times 10^5$  cfu/g.

Pemberian isolat bakteri probiotik melalui injeksi juga memberikan pengaruh yang nyata terhadap populasi *A. hydrophila* pada hati ikan jelawat ( $p < 0,05$ ). Seperti populasi *A. hydrophila* pada ginjal, pada

hati juga diperoleh jam ke-1 dan ke-6 antar perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ). Selanjutnya mulai jam ke-12 populasi bakteri *A. hydrophila* antara perlakuan DD3 dengan perlakuan lainnya memberikan perbedaan yang nyata hingga jam ke-36.

Pada ikan uji perlakuan kontrol positif, kecepatan infeksi yang ditandai munculnya radang dan waktu penyembuhan yang lebih lama, diduga diakibatkan rusaknya jaringan tubuh sehingga ikan uji tidak mampu meningkatkan mekanisme respons imunitasnya, baik seluler maupun humoral. Infeksi *A. hydrophila* berkembang cepat dalam waktu 24 jam setelah infeksi, sehingga pertahanan awal yang baik sangat penting untuk mencegah serangan infeksi penyakit. Hal ini terlihat pada ikan jelawat pada pemberian probiotik dengan isolat DM1, DDD1 dan DS3, selain dapat mengurangi gejala klinis setelah penginjeksian *A. hydrophila* juga mengalami peradangan yang berlangsung lebih lambat serta waktu penyembuhan yang lebih cepat, sedangkan pada perlakuan probiotik dengan isolat DD3 mampu mencegah infeksi *A. hydrophila*, sehingga tidak terdapat gejala radang pada tubuh ikan uji.

Gejala klinis yang ditimbulkan akibat infeksi *A. hydrophila* pada ikan jelawat sedikit berbeda dengan infeksi pada ikan umumnya. Pada ikan jelawat gejala klinis yang muncul berupa peradangan kulit hingga seluruh tubuh berwarna kemerahan, tetapi belum mengakibatkan borok terhadap permukaan tubuh. Peradangan terlihat jelas mulai jam ke-6 pasca infeksi *A. hydrophila*, dengan reaksi peradangan yang terjadi disekitar situs masuknya *A. hydrophila*. Namun demikian hingga ikan jelawat mengalami kematian peradangan tidak menimbulkan borok.

Hasil penelitian membuktikan bahwa kandidat proiotik yang digunakan dapat menghambat infeksi *A. hydrophila*, sehingga kelangsungan hidup ikan lebih tinggi dibandingkan perlakuan tanpa kandidat probiotik. Pemanfaatan probiotik sebagai sarana pengendalian penyakit pada usaha budidaya sangat tepat digunakan, karena dapat meningkatkan ketahanan

tubuh ikan. Mekanisme kerja probiotik dalam mengendalikan penyakit meliputi penghambatan patogen melalui produksi senyawa-senyawa antagonistik, kompetisi untuk tempat-tempat pelekatan, kompetisi untuk nutrien-nutrien, perubahan aktivitas enzimatik dari patogen-patogen, fungsi-fungsi imunostimulator dan keuntungan-keuntungan nutrisi seperti memperbaiki pencernaan pakan dan pemanfaatan pakan (Kesarcodei-Watson *et al.*, 2008).

### Identifikasi bakteri terpilih

Isolat yang diperoleh meski telah diuji patogenitasnya dan mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* perlu dikarakterisasi dan diidentifikasi untuk keperluan kontrol kualitas. Hasil karakterisasi isolat DD3 menunjukkan bahwa DD3 adalah bakteri Gram negatif, berbentuk batang panjang, bersifat motil, koloninya berwarna putih abu-abu, tepian licin, dengan bentuk koloni bundar cembung pada media TSA-agar. Hasil analisis sekuen sebagian gen 16s-rRNA menunjukkan bahwa isolat tersebut termasuk strain *Proteus mirabilis* dengan indeks kemiripan 98%.

### KESIMPULAN

Bakteri probiotik yang diisolasi dari usus dan media pemeliharaan ikan jelawat menunjukkan kemampuan menghambat *S. iniae*, *F. columnaris*, *M. fortuitum* dan *A. hydrophila* secara *in vitro*.

Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri yang paling virulen pada ikan jelawat dengan mortalitas 100% pada konsentrasi  $10^6$  cfu/ml.

Isolat DD3 atau *Proteus mirabilis* dapat digunakan sebagai calon probiotik karena mampu memberikan kelangsungan hidup 100% pada ikan jelawat yang diinfeksi dengan *A. hydrophila*.

### DAFTAR PUSTAKA

Aslamyah, S. 2006. Penggunaan mikroflora saluran pencernaan sebagai probiotik untuk meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan bandeng.

- [Disertasi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Atlas, R.M., Richard, B. 1993. *Microbial Ecology Fundamentals and Applications*. Third Edition. The Benjamin Cumming Public Company Inc. 547 pp.
- Effendi, M.I. 2002. *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusatama, Yogyakarta. 163 hal.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147-165.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1–14
- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: Manajemen PT. Raja Grafindo Persada.
- Mattjik, A.A., Made, S. 2000. *Perancangan percobaan dengan aplikasi SAS dan Minitab Jilid I*. IPB Press, Bogor. 326 hal.
- Marchesi. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *J. Appl. Environ. Mikrobiol.* 64, 795-799.
- Muliani, Suwanto, A., Hala, Y. 2003. Isolasi dan karakterisasi bakteri asal laut Sulawesi untuk biokontrol penyakit vibriosis pada larva udang windu (*Penaeus monodon* Fab.). *Hayati* 10, 6-11.
- Pelczar, M.J.Jr., Chan, E.C.S. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi 2*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 997 hal.
- Sugita, H., Shibuya, K., Shimooka, H., Deguchi, Y. 1996. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture* 145, 195-203.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture: review. *Journal Microbiology and Molecular Biology* 64, 655-671.
- Widanarni. 2004. *Penapisan bakteri probiotik untuk biokontrol vibriosis pada larva udang windu. Konstruksi penanda molekuler dan esei pelekatan* [Disertasi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.