

## Isolasi dan Seleksi *Bacillus* sp. dari Ikan Lele (*Clarias* sp.) serta Potensinya sebagai Probiotik (Isolation and Selection of *Bacillus* sp. from Catfish (*Clarias* sp.) as a Potential Probiotic)

Hamtini<sup>1</sup>, Widanarni<sup>2</sup>, & Anja Meryandini<sup>3</sup>

<sup>1</sup>PS Mikrobiologi, Sekolah Pasca Sarjana IPB, Darmaga 16680, Bogor Indonesia, <sup>2</sup>Departemen Budidaya Perairan, FPIK-IPB, Darmaga 16680, Bogor Indonesia, <sup>3</sup>Departemen Biologi FMIPA-IPB, Darmaga 16680, Bogor Indonesia. E-mail: hamtini.bio05@gmail.com

Memasukkan: Juni 2014, Diterima: September 2014

### ABSTRACT

The aims of this study was to isolate and select *Bacillus* from the gut of catfish as probiotic candidates in the fish feed production. Isolation was conducted by heating samples at 80 °C for 10-15 minutes using *Tryptone Soy Agar* (TSA) media which have been added with 1% skim milk for proteolytic activity and 1% starch for amylolytic activity. Selection was conducted based on pathogenicity test, antibiotic susceptibility test and total suspended solids. Isolate that have ability to degrade feed would be made the growth curves, analysis of protease and amilase activities and also combination of bacteria isolate with feed. Selected isolates as candidate probiotic were identified furthermore using 6S-rRNA gene. Among 16 isolates, there were 7 isolates that have gamma hemolytic activity (PTB 1.1, PTB 1.2, PTB 1.4, PTB 1.7, STB 1.6, STB 1.1 and STB 2.1). Antibiotic susceptibility test showed that 3 isolates were sensitive to the tested antibiotics (PTB 1.4, PTB 1.7 and STB 1.6). These three selected isolates were tested for their ability to degrade fish feed. PTB 1.4 isolate was able to degrade the feed with the smallest residue on the filter paper (0.0068 g). PTB 1.4 isolate also has proteolytic and amylolytic index of 0.61 and 0.60, respectively. Amylase activity of PTB 1.4 isolate added with 1.2% feed reached the highest peak in 120-hour of observation time (0.399 µ/mL) and the highest protease activity was in 72-hour of observation time (6.595 µ/mL). PTB 1.4 isolate has the ability to degrade the feed with the amount of 10<sup>6</sup> CFU/mL inoculum. Based on 16S-rRNA gene sequences isolate PTB 1.4 was 99% homolog with *Bacillus megaterium*. Isolation and selection of probiotic candidate from *Clarias* sp. get PTB 1.4 was a best isolate that there were not pathogenic, sensitive to antibiotic test, had protease and amilase activities. PTB 1.4 isolate had capability to degrade the feed.

**Keywords:** *Bacillus*, *Clarias* sp., probiotic, feed

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menyeleksi *Bacillus* dari usus ikan lele sebagai kandidat probiotik dalam pembuatan pakan ikan. Isolasi dilakukan dengan pemanasan sampel pada suhu 80 °C selama 10-15 menit menggunakan media *Tryptone Soy Agar* (TSA) yang ditambahkan 1% susu skim untuk aktivitas proteolitik dan 1% pati untuk aktivitas amilolitik. Seleksi bakteri probiotik meliputi uji patogenitas, uji kepekaan antibiotik dan total padatan tersuspensi. Isolat yang memiliki kemampuan degradasi pakan terbesar selanjutnya akan dibuat kurva pertumbuhan, aktivitas amilase dan protease serta proses penggabungan bakteri dengan pakan ikan. Isolat yang terseleksi sebagai kandidat probiotik selanjutnya diidentifikasi gen 16S-rRNA. Dari 16 isolat yang berhasil diisolasi, ada 7 isolat memiliki aktivitas hemolisis gamma (PTB 1.1, PTB 1.2, PTB 1.4, PTB 1.7, STB 1.6, dan STB 1.1). Uji kepekaan terhadap antibiotik menunjukkan 3 isolat yang peka terhadap antibiotik yang diuji (PTB 1.4, PTB 1.7 dan STB 1.6). Tiga isolat terpilih ini diuji kemampuannya dalam mendegradasi pakan ikan. Isolat PTB 1.4 mampu mendegradasi pakan dengan sisa pada kertas saring terkecil yaitu 0,0068 g. Isolat PTB 1.4 juga memiliki indeks proteolitik dan amilolitik sebesar 0,61 dan 0,60. Hasil pengukuran aktivitas enzim amilase isolat PTB 1.4 yang ditambahkan 1.2% pakan tertinggi pada 120 jam pengamatan sebesar 0,399 µ/mL dan aktivitas tertinggi protease pada 72 jam pengamatan sebesar 6,595 µ/mL. Isolat PTB 1.4 memiliki kemampuan untuk mendegradasi pakan dengan jumlah inokulum akhir 10<sup>6</sup> CFU/mL. Berdasarkan analisis sekuen gen 16S-rRNA isolat PTB 1.4 memiliki kesamaan 99% dengan *Bacillus megaterium*. Isolasi dan seleksi kandidat probiotik dari ikan lele mendapatkan isolat PTB 1.4 sebagai isolat terbaik karena tidak bersifat patogen, peka terhadap antibiotik yang diuji, memiliki aktivitas enzim protease dan amilase serta kemampuan mendegradasi pakan terbaik.

**Kata Kunci:** *Bacillus*, *Clarias* sp., probiotik, pakan

## PENDAHULUAN

Ikan lele (*Clarias sp.*) merupakan salah satu komoditas ekspor hasil perikanan yang memiliki kandungan gizi serta protein yang tinggi. Berdasarkan data Kementerian Kelautan dan Perikanan (2010) produksi ikan lele menempati urutan ketiga sebesar 273,554 ton di bawah ikan nila dan ikan mas. Budi daya ikan lele tidak luput dari berbagai macam permasalahan diantaranya mengenai tingkat pencernaan pakan. Proporsi pakan yang digunakan dalam jumlah yang sedikit menyebabkan terjadinya eutrofikasi dan pengayaan material organik yang tinggi pada dasar kolam (Antony & Philip 2006).

Aplikasi probiotik merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk menangani permasalahan ini. Probiotik untuk akuakultur didefinisikan sebagai mikroba hidup yang menguntungkan bagi inang dengan memodifikasi hubungan komunitas mikroba yang dapat berasosiasi dengan inang atau lingkungannya dalam meningkatkan penggunaan pakan atau nilai nutrisi, memacu respon inang terhadap penyakit, atau dengan meningkatkan kualitas perairan (Verschuere *et al.* 2000). Pada peningkatan nilai nutrisi pakan, bakteri probiotik memiliki mekanisme dalam menghasilkan beberapa enzim *exogenous* untuk pencernaan pakan seperti amilase, protease, lipase dan selulase (Bairagi *et al.* 2002; Aslamyah 2006; Wang *et al.* 2008). Spesies *Bacillus* banyak yang dapat menghasilkan enzim ekstraseluler seperti protease, amilase dan kitinase serta digunakan di industri secara luas, selain itu dapat dibuat dalam bentuk kering sehingga mudah ditambahkan ke dalam pakan buatan (Fleming *et al.* 1995; Gatesoupe 1999; Suryadi *et al.* 2013).

Murni (2004) menyatakan bahwa penambahan bakteri probiotik *Bacillus sp.* ke dalam pakan menyebabkan adanya peningkatan aktivitas enzim protease dan amilase sehingga pencernaan protein dan karbohidrat meningkat. Sun *et al.* (2010) menyatakan bahwa pemberian *Bacillus pumilus* dan *Bacillus clausii* dapat memperbaiki efisiensi pakan

## BAHAN DAN CARA KERJA

Usus ikan lele disuspensikan secara terpisah ke dalam 9 ml larutan garam fisiologis steril dan dihomogenkan. Tabung reaksi yang telah berisi sampel diencerkan secara serial pada pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-3}$  serta diberi renjatan panas pada suhu 80 °C selama 10-15 menit. Metode ini sudah menjadi cara umum untuk menyeleksi *Bacillus*, karena bakteri ini merupakan penghasil endospora. Larutan sampel sebanyak 0,1 ml disebar pada media TSA (*Tryptone Soy Agar*) yang telah ditambahkan susu skim dan pati. Inokulum dikultur dengan metoda cawan sebar pada pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-3}$  dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

Isolat bakteri diuji patogenitasnya dengan digoreskan pada media agar darah. Biakan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Isolat dengan aktivitas gamma hemolisis atau tidak terbentuknya zona bening di sekitar koloni akan diambil untuk diuji lanjut.

Isolat diuji kepekaannya terhadap 3 jenis antibiotik yaitu amoxicillin 20 µg/ml, rifampisin 5 µg/ml, dan ciprofloxacin 5 µg/ml. Kepekaan antibiotik dihitung berdasarkan ukuran zona hambat yang terbentuk menggunakan metode sumur. Interpretasi zona hambatan untuk resistensi, intermediet dan peka ditentukan berdasarkan CLSI (2007).

Pakan ikan dengan konsentrasi 1.2% dalam 100 ml akuades sebagai substrat disterilisasi pada suhu 121 °C 15 menit. Substrat diinokulasi dengan 10 ml kultur isolat bakteri dengan jumlah sel  $10^8$  CFU/ml, kemudian di *shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama 120 jam. Sebanyak 10 ml kultur disaring dengan kertas saring GFC (47 mm Ø circles, Whatman) dalam wadah penyaring yang dihubungkan dengan erlenmeyer bercorong.

Pengujian ini bertujuan untuk mengukur kemampuan aktivitas proteolitik dan amilolitik isolat terpilih melalui uji hidrolisis susu skim dan pati. Kemampuan hidrolisis ditandai dengan adanya zona bening di sekeliling isolat.

Satu ose koloni tunggal bakteri diinokulasikan

pada 20 ml media TSB (*Triptone Soya Broth*). Sebanyak 10 mL kultur bakteri diinokulasikan pada 100 ml kultur pakan 1.2%. Kultur diinkubasi pada *water bath shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Setiap selang waktu 24 jam selama 120 jam kultur diambil untuk pengujian aktivitas protease dan amilase.

Enzim diperoleh dengan cara mensentrifugasi kultur pada kecepatan 5000x g selama 30 menit. Aktivitas protease diukur berdasarkan metode Walter (1984). Tiga tabung reaksi disediakan untuk pengujian yang terdiri atas sampel, kontrol dan blanko. Sampel ditambahkan 0.1 ml ekstrak kasar enzim, kontrol diisi dengan 0.1 ml tirosin 0.37 mmol L<sup>-1</sup>, sedangkan blanko diisi dengan 0.1 mL aquades. Campuran dikocok sampai homogen lalu diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Sampel ditambah 1 ml asam trikloro asetat (TCA). Untuk standar, enzim ditambahkan setelah pemberian TCA, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000x g selama 30 menit. Endapan dibuang sedangkan supernatan ditambahkan 2.5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dan pereaksi *Folin Cicalteau* (1:2) kemudian homogenkan. Setelah didiamkan 20 menit setiap perlakuan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.

Aktivitas amilase diukur menurut metode Bernfeld (1955). Tiga tabung reaksi disediakan untuk pengujian yang terdiri atas sampel, kontrol dan blanko. Sampel ditambahkan 1 ml enzim dalam substrat yang dilarutkan dalam buffer fosfat 0.05 M, pH 7.5, diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit kemudian ditambahkan 2 ml reagen asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Kontrol dan blanko dibuat dengan menggunakan komposisi yang sama tetapi enzim ditambahkan setelah pemberian DNS, namun blanko ditambahkan dengan aquades. Sampel, kontrol dan blanko dididihkan selama 5 menit untuk menghentikan reaksi. Gula pereduksi yang dihasilkan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm.

Koloni tunggal diinokulasikan ke dalam 20 mL medium cair TSB, diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Sebanyak 10 mL kultur segar diinokulasikan ke dalam media TSB steril sebanyak 90 ml, di *shaker* 120 rpm selama 24 jam. Pertumbuhan

bakteri diamati setiap 2 jam dengan mengukur nilai kerapatan optik pada panjang gelombang 620 nm dan dicawakan (Hadioetomo 1993).

Bakteri diinokulasi dalam media TSB selama waktu yang telah ditetapkan dari hasil pembuatan kurva pertumbuhan. Kultur bakteri kemudian disentrifugasi dan hasil endapan diambil 1 ml (10<sup>8</sup> CFU/ml berdasarkan kurva pertumbuhan) ditambahkan pada 50 gram pakan dan 1 gram CMC (*Carboxy-Methyl-Cellulose*) kemudian di *oven* pada suhu 37 °C selama 48 jam. Ketahanan bakteri diperoleh dari hasil membandingkan jumlah koloni bakteri sebelum dan setelah proses pembuatan pelet.

Amplifikasi gen penyandi 16S rRNA dengan primer 63f (5'CAG GCC TAA CACATG CAA GTC-3') dan primer 1387r (5'-GGG GGG WGT GTA CAA CGC-3') Marchesi *et al.* (1998). Komposisi *master mix* PCR setiap tabung terdiri atas 25 µl *GoTaq* (Promega), 4 µl primer 63f, 14 µl primer 1387r, 17 µl ddH<sub>2</sub>O. DNA cetakan diambil dengan tusuk gigi secara langsung dari isolat *Bacillus*. Kondisi PCR sebagai berikut: *pradenaturasi* 95 °C selama 5 menit, *denaturasi* 95 °C selama 1 menit, *annealing* primer 55 °C selama 1 menit, *elongasi* 72 °C selama 1 menit, dan *post* PCR pada suhu 72 °C selama 5 menit. Proses amplifikasi pada mesin PCR terdiri atas 30 siklus. Penghentian reaksi dilakukan dengan penurunan suhu ke 4 °C. Produk PCR divisualisasikan pada gel agarose 1% dalam bufer TAE 1x pada 80 volt selama 45 menit.

Penentuan urutan gen dilakukan dengan mengirimkan DNA hasil amplifikasi ke perusahaan penyedia jasa sekuensing. *Mega 5 software* digunakan untuk analisis data kasar hasil sekuensing dan di *alignment* sekuen DNA. Sekuennya disejajarkan dengan *data base* di Gene Bank menggunakan program BLAST-N online *software* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## HASIL

### Isolasi *Bacillus* sp. dari Usus Ikan Lele

Hasil isolasi dari usus ikan lele diperoleh 16 isolat dan setelah pewarnaan spora 14 diantaranya adalah *Bacillus* sp. (Tabel 1).

### Seleksi *Bacillus* sp. sebagai Kandidat Probiotik Uji Patogenitas

Hasil uji patogenitas dengan inokulasi isolat pada media agar darah menunjukkan bahwa dari 14 isolat yang diuji terdapat 2 isolat yang memiliki aktivitas beta hemolisis, 5 isolat alfa hemolisis dan 7 isolat dengan aktivitas gamma hemolisis (Tabel 2).

### Uji Kepekaan Antibiotik

Data uji kepekaan terhadap 3 jenis antibiotik tersebut disajikan pada Tabel 3. Resisten rifampisin dan amoxicillin ditunjukkan oleh isolat STB 1.1, STB 2.1, PTB 1.1, dan PTB 1.2, sedangkan intermediet amoxicillin ditunjukkan oleh isolat PTB 1.1, dan PTB 1.2 (Tabel 3). Isolat yang masih sensitif terhadap antibiotik yang uji adalah STB 1.6, PTB 1.4 dan PTB 1.7.

### Uji Total Padatan Tersuspensi (TSS)

Penurunan total padatan tersuspensi pada pakan yang ditambahkan isolat-isolat *Bacillus* ditunjukkan pada Tabel 4. Isolat PTB 1.4 memiliki kemampuan mendegradasi pakan dengan sisa pakan pada kertas saring terkecil yaitu 0,0068 g. Kontrol tanpa penambahan kultur bakteri memiliki kemampuan degradasinya lebih kecil dengan sisa pada kertas saring terbesar yaitu 0,0163 g.

**Tabel 1.** Isolat yang diperoleh dari usus ikan lele

Media	Jumlah isolat	Isolat*
TSA + Pati 1%	8	PTB 1.1, PTB 1.2, PTB 1.3, PTB 1.4, PTB 1.5, PTB 1.6, PTB 1.7, PTB 2.0
TSA + susu skim 1%	8	STB 1.1, STB 1.5, STB 1.6, STB 2.1, STB 2.2, STB 2.3, STB 2.4, STB 2.5

\*P: Pati, S: Skim, TB: Tembok (Ikan lele diambil dari kolam tembok),

**Tabel 2.** Uji patogenitas menggunakan media agar-agar darah

Hemolisis	Jumlah isolat	Isolat
Beta ( $\beta$ )	2	PTB 1.3, PTB 2.0
Alfa ( $\alpha$ )	5	PTB 1.5, PTB 1.6, STB 1.5, STB 2.2, STB 2.3
Gamma ( $\gamma$ )	7	PTB 1.1, PTB 1.2, PTB 1.4, PTB 1.7, STB 1.1, STB 1.6, STB 2.1

### Aktivitas Proteolitik dan Amilolitik

Isolat PTB 1.4 memiliki aktivitas proteolitik dan amilolitik dengan ditandai adanya zona bening di sekitar koloni (Gambar 1). Indeks proteolitik (IP) untuk isolat terpilih berkisar antara 0,60 dan amilolitik (IA) adalah 0,61.

### Aktivitas Protease dan Amilase

Kurva aktivitas protease dan amilase dapat dilihat pada Gambar 2. Aktivitas tertinggi protease tercapai pada 72 jam pengamatan yaitu sebesar 6,595  $\mu$ /ml Aktivitas tertinggi amilase pada 120 jam pengamatan yaitu sebesar 0,399  $\mu$ /ml.

### Kurva Pertumbuhan

Selama 24 jam pengamatan isolat PTB 1.4 menunjukkan pola pertumbuhan yang diawali oleh fase lag diikuti fase eksponensial dan fase statis. Fase lag atau fase pertumbuhan awal terjadi antara 0 dan 2 jam (Gambar 3).

### Pembuatan Pelet

Isolat PTB 1.4 memiliki kemampuan untuk memanfaatkan sumber pakan yang telah ditambahkan kultur bakteri dan CMC. Jumlah inokulum awal adalah  $10^8$  CFU/ml setelah digabungkan pada pakan dan CMC serta diinkubasi 10 menit pada suhu 60 °C jumlah inokulum akhir menjadi  $10^6$  CFU/ml.

Tabel 3. Kepekaan isolat terhadap 3 jenis antibiotik berdasarkan diameter zona hambat (mm) yang terbentuk.

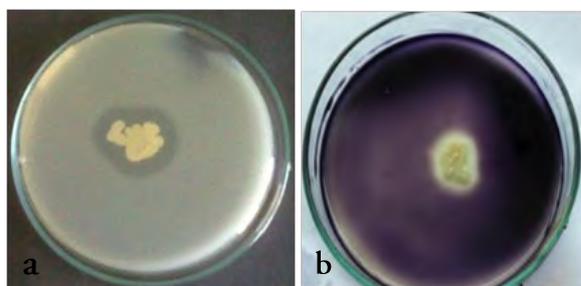
Kode Isolat	Jenis Antibiotik <sup>a</sup>						Isolat terpilih
	Rifampisin		Amoxicillin		Ciprofloxacin		
	Ø	Status	Ø	Status	Ø	Status	
STB 1.1	15	R	10	R	35	S	-
STB 1.6	25	S	30	S	33	S	√
STB 2.1	23	S	0	R	40	S	-
PTB 1.1	27	S	20	I	27	S	-
PTB 1.2	30	S	20	I	40	S	-
PTB 1.4	29	S	37	S	32	S	√
PTB 1.7	25	S	31	S	40	S	√

<sup>a</sup>Standar resistensi rifampisin 5µg/mL: ≤16 mm resisten, 17-19 mm intermediet, ≥20 sensitif; amoxicillin 20µg/mL: ≤13 mm resisten, 14-16 mm intermediet, ≥17 sensitif; ciprofloxacin 5µg/mL: ≤15 mm resisten, 16-20 mm intermediet, ≥21 sensitif; Ø: diameter zona hambat. S = sensitif, I = Intermediet dan R = resisten (CLSI 2007).

Tabel 4. Penurunan total padatan tersuspensi (TSS) isolat-isolat *Bacillus*.

Isolat	Ks + filtrat (g)	Ks (g)	Volum (mL)	TSS (g)
PTB 1.4	0,1179	0,1111	10	0,0068
PTB 1.7	0,1215	0,1110	10	0,0105
STB 1.6	0,1215	0,1127	10	0,0088
Kontrol <sup>b</sup>	0,1288	0,1125	10	0,0163

<sup>b</sup>Tidak ada penambahan kultur bakteri; Ks: kertas saring



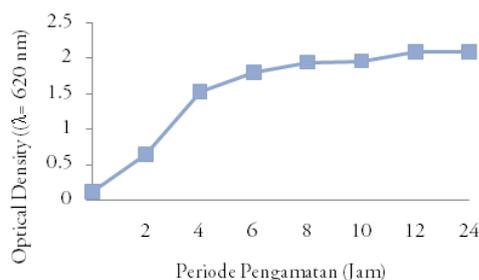
Gambar 1. Zona bening yang terbentuk, a. 1% susu skim, b 1% pati

### Identifikasi 16S-rRNA

Identifikasi hasil sekuensing parsial gen penyandi 16S-rRNA isolat PTB 1.4 menggunakan database pada analisa BLAST-N. Hasil pensejajaran 1011 bp menunjukkan bahwa isolat PTB 1.4 memiliki kedekatan dengan *Bacillus megaterium* pada indeks similitas sebesar 99% (Tabel 5).



Gambar 2. Aktivitas enzim ekstraseluler isolat PTB 1.4, a Aktivitas protease, b Aktivitas amilase.



**Gambar 3.** Kurva nilai kerapatan Optik (*Optical Density*). Isolat PTB 1.4 yang ditumbuhkan pada media TSB, pH 7.2, dan di *shaker* 120 rpm pada suhu ruang selama 24 jam

## PEMBAHASAN

Suatu probiotik yang baik seharusnya diisolasi dari hewan inang, habitat atau pakannya sehingga dapat beradaptasi dengan lingkungan dan saluran pencernaan. Menurut Verschuere *et al.* (2000) probiotik merupakan agen mikroba hidup yang memberikan pengaruh menguntungkan pada inangnya dengan berbagai macam interaksi, salah satunya adalah menjamin perbaikan dalam penggunaan pakan atau mem-perbaiki nilai nutrisinya.

Beberapa spesies *Bacillus* yang dilaporkan untuk probiotik pada sistem akuakultur, diantaranya adalah *Bacillus coagulans* SC8168 (Zhou *et al.* 2009), *Bacillus* spp. (Ziaei-Nejad *et al.* 2006),

dan *Bacillus* S11 (Rengpipat *et al.* 2000). Selain itu juga Hong *et al.* (2005) mengatakan bahwa spora dari genus *Bacillus* memiliki keunggulan dibandingkan sel vegetatif, karena stabil dalam jangka waktu yang lama serta dapat dijadikan produk komersial yang berguna.

Bakteri yang mampu melisis sel darah merah bersifat lebih virulen dibandingkan yang tidak mampu melisis sel darah merah, sehingga pada penelitian ini dilakukan uji patogenitas menggunakan agar darah. Media agar darah merupakan media differensial, media ini digunakan untuk membedakan bakteri berdasarkan kemampuan melisis sel darah merah. Ada 3 tipe hemolisis, (1) beta hemolisis disebut sebagai lisis lengkap sel darah merah dan hemoglobin, sehingga media yang ada koloninya menjadi bening, (2) gamma hemolisis yang ditandai tidak ada perubahan warna dalam media sedangkan (3) alfa hemolisis disebut sebagai lisis sebagian dari sel darah merah dan hemoglobin (Suryanto *et al.* 2007).

Salah satu kriteria untuk bakteri probiotik adalah kerentanan terhadap salah satu atau lebih antibiotik yang umum digunakan pada manusia dan hewan akuatik. Uji kepekaan isolat terhadap beberapa antibiotik dilakukan dengan menggunakan 3 jenis antibiotik yang berbeda mekanisme aksinya menunjukkan bahwa dari 7 isolat yang diseleksi hanya 3 isolat yang masih peka terhadap antibiotik

**Tabel 5.** Hasil BLAST-N gen sekuen 16S-rRNA isolat PTB 1.4

Nama Spesies	Homologi	Nomor Assesi
<i>Bacillus</i> sp. WP-XY01-5	99	KF052591.1
<i>Bacillus megaterium</i> strain RD30	99	KJ534462.1
<i>Bacillus megaterium</i> strain S-3	99	KJ572280.1
<i>Bacillus megaterium</i> strain RC55	99	KJ534461.1
<i>Bacillus megaterium</i> strain RB132	99	KJ534460.1
<i>Bacillus megaterium</i> strain LA141	99	KJ534459.1
<i>Bacillus megaterium</i> strain RA138	99	KJ534458.1
<i>Bacillus megaterium</i> strain BMN1	99	KJ461522.1
<i>Bacillus megaterium</i> strain RLS12	99	KF957737.1
<i>Bacillus megaterium</i> strain RHO3	99	KF957730.1

yang diuji. Faturrahman (2012) melaporkan bahwa dari 14 isolat kandidat probiotik yang diuji sensitifitasnya terhadap 4 jenis antibiotik (tetrasiklin, rifampisin, ampisilin dan vankomisin) hanya diperoleh 7 isolat yang bersifat sensitif. Bakteri resisten bila digunakan akan dapat meningkatkan potensi ancaman melalui transfer gen resistensi kepada patogen manusia lewat saluran *gastrointestinal* atau lingkungan (Faturrahman 2012).

Berbagai galur bakteri dalam saluran pencernaan mempunyai kemampuan merubah substrat makanan menjadi metabolit potensial dengan menghasilkan enzim pencernaan sehingga metabolit potensial tersebut dapat dimanfaatkan oleh inangnya (Lisal 2005). Kemampuan isolat dalam mendegradasi pakan didukung oleh kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim ekstraseluler untuk memecah senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana. Spesies *Bacillus* banyak yang menghasilkan enzim ekstraseluler dan digunakan secara luas bagi industri, seperti protease dan amilase (Fleming *et al.* 1995). Prinsip dasar kerja probiotik pada akuakultur salah satunya adalah pemanfaatan kemampuan mikroorganisme dalam memecah atau menguraikan rantai panjang karbohidrat, protein dan lemak yang menyusun pakan yang diberikan (Feliatra *et al.* 2004). Isolat PTB 1.4 yang memiliki kemampuan degradasi tertinggi dilakukan uji proteolitik dan amilolitik serta dilihat aktivitas amilase dan proteasenya.

Isolat PTB 1.4 memiliki aktivitas proteolitik dan amilolitik ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni. Lim & Rahim (1987) menyeleksi isolat penghasil enzim potensial berdasarkan indeks aktivitas tertinggi. Namun uji aktivitas proteolitik dan amilolitik yang dilakukan hanya bersifat kualitatif berdasarkan zona bening yang dihasilkan, sehingga untuk mengetahui aktivitas enzimnya secara kuantitatif dilakukan pengukuran aktivitas enzim ekstraselulernya.

Kontribusi enzimatik dari bakteri probiotik bagi inang berupa peningkatan aktivitas enzim pencernaan seperti amilase, protease dan lipase (Ziaei-Nejad *et al.* 2006). Aktivitas protease lebih tinggi pada *Bacillus cereus* yang diisolasi dari usus

ikan dibandingkan dengan sumber lainnya (Essakiraj *et al.* 2008). Hal ini sesuai dengan hasil yang didapat bahwa isolat PTB 1.4 yang diisolasi dari usus ikan lele memiliki aktivitas protease yang tinggi dibandingkan dengan aktivitas amilase. Jamilah *et al.* (2009) *Bacillus* sp. DA 5.2.3 dapat memanfaatkan protein dan karbohidrat dari pakan udang sebagai sumber nitrogen dan karbon dengan aktivitas protease lebih tinggi (47.3 U<sub>mg</sub><sup>-1</sup>) dibandingkan aktivitas amilase (40.9 U<sub>mg</sub><sup>-1</sup>).

Pengamatan fase pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mengamati perubahan populasi dan nilai kerapatan optik. Isolat PTB 1.4 pada jam ke 8 pengamatan dengan jumlah sel 10<sup>8</sup> CFU/ml sehingga waktu tersebut digunakan sebagai dasar permanen sel bakteri. Menurut Faturrahman (2012) bahwa isolat kandidat probiotik yang baik adalah yang memiliki laju pertumbuhan tercepat hal ini dikarenakan berhubungan dengan kemampuan isolat untuk berkompetisi dengan bakteri lain untuk menempel pada saluran pencernaan. Sebagian besar mikroorganisme uniseluler tumbuh eksponensial namun dengan laju yang bervariasi karena dipengaruhi oleh berbagai kondisi lingkungan seperti, suhu, substansi kimia dan ciri genetika dari mikroorganisme (Madigan *et al.* 2009).

Kualitas pakan sangat menentukan laju pertumbuhan dari hewan budi daya, pakan yang berkualitas selain dihasilkan dari sumber bahan pakan dapat juga dihasilkan dengan penambahan enzim pada pakan. Murni (2004) melaporkan bahwa penambahan probiotik *Bacillus* sp. (4.2 x 10<sup>4</sup> CFU/ml) dalam pakan buatan dapat meningkatkan pencernaan, efisiensi pakan dan pertumbuhan ikan gurami, sedangkan penambahan probiotik *Bacillus* sp. (4.2 x 10<sup>6</sup> CFU/ml) pada pakan komersil menghasilkan konversi pakan dan pertumbuhan ikan patin terbaik dengan kadar optimum 15 ml/kg pakan (Jusadi *et al.* 2004).

Identifikasi gen 16S-rRNA merupakan suatu pendekatan secara molekuler yang dilakukan untuk mengetahui spesies dari isolat bakteri berdasarkan kemiripan sekuen gen dengan data pada GenBank. Berdasarkan hasil BLAST-N

isolat PTB 1.4 memiliki nilai homologi sebesar 99% dengan *Bacillus megaterium* (Tabel 5). Homologi menunjukkan bahwa sekuen tersebut memiliki hubungan evolusi (Pertsemlidis & Fondon III 2002). *Bacillus megaterium* digunakan sebagai probiotik dapat memproduksi enzim-enzim pencernaan seperti protease, amilase dan lipase (Solano & Olmos 2006).

## KESIMPULAN

Sebanyak 16 isolat telah berhasil diisolasi dari usus ikan lele dan 14 diantaranya adalah *Bacillus* sp. Seleksi kandidat probiotik menghasilkan isolat PTB 1.4 sebagai isolat terbaik karena tidak bersifat patogen, peka terhadap antibiotik yang diuji, memiliki aktivitas enzim protease sebesar 6.595 µ/ml dan aktivitas amilase sebesar 0,399 µ/ml serta kemampuan mendegradasi pakan terbaik dengan sisa pakan pada kertas saring terkecil yaitu 0,0068 g. Identifikasi gen 16S-rRNA menunjukkan bahwa isolat PTB 1.4 memiliki kedekatan dengan *Bacillus megaterium* sebesar 99%.

Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh pemberian kandidat bakteri probiotik yang ditambahkan pakan pada ikan terhadap pertumbuhannya, sehingga pakan yang diberikan oleh petani dapat terserap lebih banyak oleh ikan dan tidak terbuang ke lingkungan sehingga kualitas lingkungan dapat terjaga.

## DAFTAR PUSTAKA

- Antony, SP., & R. Philip. 2006. Bioremediation in shrimp culture system. *Articles. Naga. Worldfish. Center. Quarter.* 29: 62-66.
- Aslamyah, S. 2006. Penggunaan Mikroflora Saluran Pencernaan sebagai Probiotik untuk Meningkatkan Mertumbuhan dan Kelangsungan Hidup Ikan Bandeng. [Disertasi]. Bogor: IPB.
- Bairagi, A., KS. Ghosh, SK. Sen, & AK. Ray. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Journal of Aquaculture International.* 10: 109-21.
- Bernfeld, P. 1955. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ . *Method Enzymology.* 1:149-58.
- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. *Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing.* Twenty-Second Informational Supplement. Pennsylvania. USA.
- Essakiraj, P., G. Immanuel, Sowmya, P. Iyaparaj, & A. Palevesam. 2009. Evaluation of protease-producing ability of fish gut isolate *Bacillus cereus* for aqua feed. *Journal of Food and Bioprocess Technology.* 2: 383-390.
- Feliatra., I. Efendi, & E. Suryadi. 2004. Isolasi dan identifikasi bakteri probiotik dari ikan kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam upaya efisiensi pakan ikan. *Jurnal Natur Indonesia.* 6: 75-80.
- Faturrahman. 2012. Potensi Bakteri Agarolitik sebagai Penyedia Enzim Agarase untuk Memperbaiki Pertumbuhan Juvenil Abalon (*Haliotis asinina* Linn. 1758). [Disertasi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Fleming, AB., M. Tangney, PL. Jorgensen, B. Diderrichsen, & FG. Priest. 1995. Extracellular enzymes synthesis in a sporulation-deficient strain of *Bacillus licheniformis*. *Journal Apllied Environmental and. Microbiology.* 61: 3775-3780.
- Gatesoupe, FJ. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture.* 180:147-165.
- Hadioetomo, RS. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teori dan Praktek.* PT. Gramedia. Jakarta.
- Hong, HA., LH. Duc, & SM. Cutting 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *Journal of FEMS. Microbiology Review.* 29: 813-835.
- Jamilah, I., A. Meryandini, I. Rusmana, A. Suwanto, & NR. Mubarik. 2009. Activity of proteolytic and amyolytic enzymes from *Bacillus* spp. isolated from shrimp ponds. *Jurnal Microbiologi Indonesia.* 3:67-71.
- Jusadi, D., E. Gandara, & I. Mokoginta. 2004. Pengaruh penambahan probiotik *Bacillus* sp. pada pakan komersil terhadap konversi pakan dan pertumbuhan ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*). *Jurnal Akuakultur Indonesia.* 3:15-18.
- [KKP] Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2010. *Kelautan dan Perikanan dalam Angka 2010.*

- Kementerian Kelautan dan Perikanan. Jakarta.
- Lim, G., TK. Tan, & NA. Rahim. 1987. Variations in amylase and protease activities among *Rhizopus* isolates. *MIRCEN Journal*. 3:319-322.
- Lisal, JS. 2005. Konsep probiotik dan prebiotik untuk modulasi mikrobiota usus besar. *Medical Nusantara*. <http://apwardhanu.wordpress.com/2010/09/25/konsep-probiotik-dan-prebiotik-untuk-modulasi-mikrobiota-usus-besar/>. html.
- Madigan, MT., JM. Matinko, PV. Dunlap, & DP. Clark. 2009. *Brock Biology of Microorganisms*. Edisi 12. Pearson Benjamin Cummings. San Francisco.
- Marchesi, JR., T. Sato, AJ. Weightman, TA. Martin, JC. Fry, SJ. Hiom, & WG. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S-rRNA. *Applied Environmental and. Microbiology*. 64:795-799.
- Murni. 2004. Pengaruh Penambahan Bakteri Probiotik *Bacillus* sp. dalam Pakan Buatan Terhadap Aktivitas Enzim Pencernaan, Efisiensi Pakan dan Pertumbuhan Ikan Gurame. [Tesis]. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Pertsemlidis, A., & III JW. Fondon. 2002. Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLAST phemy). *Journal Genetic Biology*. 2:1-10.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatitiratitivorakul, & P. Menasaveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Journal Aquaculture*. 167: 301-313.
- Sun, YZ., HL. Yang, RL. Ma, & WY. Lin. 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune response of grouper *Epinephelus coioides*. *Journal of Shellfish Immunology*. 29:803-809.