

Studi Komunitas Bakteri Hidrolitik Saluran Pencernaan Ikan Nilem (*Osteochilus vittatus*) yang Dibudidayakan di Kabupaten Banyumas

*Community Study of Digestive Tract Hydrolytic Bacteria of Nilem Fish (*Osteochilus vittatus*) Cultivated in Banyumas Regency*

*E. Listiowati, A. Ekasanti, D. Nugrayani, H. Syakuri, D. Wisudyanti, M. Nurhafid, dan Y. Evander

Program studi Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Jenderal Soedirman, Jln. Dr. Soeparno Komplek
GOR Soesilo Sudarman, Karangwangkal, Purwokerto 53122

*e-mail korespondensi : emyliana.listiowati@unsoed.ac.id

Abstract. Hydrolytic bacteria are bacteria that play an important role in helping the digestive process of fish. This study aims to determine the hydrolytic activity of bacteria in the digestive tract of Nilem fish seen from amylolytic, proteolytic, lipolytic and cellulitic indices. The method used is exploratory and data analysis using parametric and non-parametric to explain the research data. Exploration carried out in this study included the total number of bacteria, proportion of hydrolytic bacteria, activity index of hydrolytic bacteria and molecular identification of bacteria with the best activity index. Fish were taken at random from fish farming ponds in Beji and Singasari with three fish each. The number of bacteria found an increasing pattern to the posterior intestine of fish from Beji and a pattern that varied between parts of the intestine of fish from Singasari. Hydrolytic bacteria were isolated from each part of the intestine from both locations which showed a decreasing pattern in each type of hydrolytic and intestinal tracts of fish from Singasari and varied patterns in the intestines of fish from Beji. The hydrolytic activity index showed a stable average value in each part of the intestine and the sampling location. Based on the best activity index, seven isolates were identified from three different genera, namely 1) *Bacillus subtilis*, 2) *Enterobacter mori*, *Enterobacter cloacae*, and 3) *Aeromonas hydrophila* (3), *Aeromonas veronii*. The bacteria obtained are classified as non-pathogenic bacteria that have potential in the field of aquaculture and normal pathogenic bacteria in the fish intestine

Keywords : Hydrolytic bacteria, identification, part of gut, *Osteochilus vittatus*

Abstrak. Bakteri hidrolitik merupakan bakteri yang berperan penting dalam membantu proses pencernaan ikan. Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas hidrolitik bakteri saluran pencernaan ikan Nilem dilihat dari indeks amilolitik, proteolitik, lipolitik dan selulitik. Metode yang digunakan yaitu eksploratif dan analisis data menggunakan parametrik dan non-parametrik untuk menjelaskan data hasil penelitian. Eksplorasi yang dilakukan pada penelitian ini meliputi jumlah total bakteri, proporsi bakteri hidrolitik, indeks aktivitas bakteri hidrolitik serta identifikasi molekuler bakteri dengan indeks aktivitas terbaik. Ikan diambil secara acak dari kolam pembudidaya ikan di Beji dan Singasari dengan jumlah masing-masing tiga ekor. Jumlah bakteri mendapatkan pola yang meningkat ke bagian posterior usus ikan dari Beji dan pola yang bervariasi antar bagian usus ikan dari Singasari. Bakteri hidrolitik berhasil diisolasi dari setiap bagian usus dari kedua lokasi yang menunjukkan pola menurun di setiap jenis hidrolitik dan bagian usus ikan dari Singasari dan pola bervariasi pada bagian usus ikan dari Beji. Indeks aktivitas hidrolitik menunjukkan nilai rata-rata yang stabil pada setiap bagian usus dan lokasi sampling. Berdasarkan indeks aktivitas terbaik didapatkan sebanyak tujuh isolate yang teridentifikasi dari tiga Genus berbeda yaitu 1) *Bacillus subtilis*, 2) *Enterobacter mori*, *Enterobacter cloacae*, dan 3) *Aeromonas hydrophila* (3), *Aeromonas veronii*. Bakteri yang didapatkan tergolong dalam bakteri non-patogen yang berpotensi dibidang akuakultur dan bakteri patogen yang normal di dalam usus ikan

Kata Kunci : bakteri hidrolitik, identifikasi, bagian usus, *Osteochilus vittatus*

PENDAHULUAN

Ikan Nilem merupakan ikan dari famili *Cyprinidae* yang tersebar di perairan Sumatera, Jawa dan Kalimantan. Ikan ini adalah salah satu komoditas budidaya ikan air tawar yang terkonsentrasi di Pulau Jawa (Rahmia *et al.*, 2015). Ikan Nilem sudah dapat dibudidayakan dengan baik dan memiliki potensi dikembangkan menjadi komoditas unggulan di Banyumas, Purbalingga dan Banjarnegara karena banyak diminati oleh konsumen. Ikan Nilem termasuk dalam golongan herbivora (Rahmia *et al.*, 2015). Ikan Nilem dalam kegiatan budidaya dapat mengkonsumsi pakan buatan dengan baik. Jenis pakan yang dikonsumsi akan mempengaruhi kondisi sistem pencernaan dan absorpsi nutrient yang dimiliki oleh suatu jenis ikan (Anggani *et al.*, 2021)

Sistem pencernaan pada ikan Nilem di mulai di usus bagian depan bukan di rongga mulut, sebab tidak memiliki kelenjar air liur yang dapat menghasilkan saliva. Selain enzim, proses pencernaan dibantu oleh aktivitas bakteri dalam saluran pencernaan. Menurut Khasani, (2010; Kurniasih *et al.*, (2013) beberapa jenis bakteri memiliki peranan penting dalam meningkatkan pemanfaatan pakan, kesehatan ikan, perbaikan mutu lingkungan dan daya cerna pakan. Peranan bakteri yang menguntungkan dalam saluran pencernaan yang memiliki potensi menghasilkan enzim pencernaan eksogen telah banyak diteliti. Hasil riset Deepika *et al.*, (2019) menyatakan bahwa salah satu jenis bakteri pada saluran pencernaan ikan Gurami adalah *Bacillus* sp. yang dapat menghasilkan enzim hidrolitik seperti protease, amylase, selulase dan lipase. Pada ikan lele ditemukan aktivitas bakteri amilolitik, proteolitik dan lipolitik. Diantara bakteri yang ditemukan bakteri genus *Staphylococcus* sp. memiliki ketiga aktivitas tersebut (Kurniasih *et al.*, 2013).

Kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim hidrolitik ekstraselluler dapat dideteksi dengan menggunakan medium pengujian yaitu medium yang diperkaya dengan substrat enzimnya (Yusra & Hatta, 2019) Aktivitasnya akan ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni. Dengan keberadaan bakteri yang memiliki aktivitas hidrolitik akan meningkatkan kemampuan ikan dalam mencerna nutrisi dan lebih lanjut dapat digunakan sebagai kandidat probiotik. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui aktivitas hidrolitik bakteri saluran pencernaan ikan Nilem dilihat dari indek amilolitik, proteolitik, lipolitik dan selulitik.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode eksploratif dan hasilnya dianalisis secara statistika parametrik dan non parametrik untuk menjelaskan hasil pengamatan. Penelitian ini diawali dengan mengambil sampel pada dua tempat budidaya yang berbeda yaitu tempat budidaya ikan Nilem yang sesuai dengan SNI dalam hal ini akan diwakilkan oleh BBI Singasari dan Pembudidaya ikan Nilem (Beji). Sampel ikan dibawa ke laboratorium untuk pengamatan mikrobiologis. Pengamatan meliputi jumlah total bakteri dan pengujian aktifitas bakteri amilolitik, proteolitik, lipolitik dan selulolitik serta identifikasi bakteri dengan indeks hidrolitik terbaik.

Pengambilan Sampel Saluran Pencernaan

Sampel ikan Nilem diambil dari BBI Singasari dan Pembudidaya ikan di desa Beji. Banyaknya sampel yang diambil adalah masing-masing tiga (3) ekor ikan dengan ukuran 10 – 15 cm. Sampel ikan Nilem yang diambil adalah dari strain yang sama. Ikan diambil dan dibawa ke Laboratorium riset Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Purwokerto dalam kondisi hidup dengan transportasi basah. Sampel ikan dimatikan dengan memotong pangkal tulang belakang, diukur panjangnya, dan ditimbang beratnya dan selanjutnya dibedah untuk diambil saluran pencernaannya (usus). Saluran pencernaan diukur panjangnya dan dibedakan menjadi tiga bagian yaitu anterior, middle dan posterior.

Isolasi Mikroba

Jumlah total bakteri dihitung berdasarkan metode *total plate count* (TPC) dengan *pour plating* (Nurhafid *et al.*, 2021). Sampel usus ikan Nilem sepanjang 0,5 cm ditimbang, dimasukkan tabung 1,5 ml, dan dihaluskan dengan *pellet pastel*. Sampel dihomogenkan dengan larutan NaCl 0,9% steril sebanyak 1 ml. Pengenceran bertingkat dilakukan pada 10^{-1} sampai 10^{-5} . Tabung reaksi diisi dengan larutan NaCl 0,9 % steril sebanyak 4,5 ml/tabung dan sampel usus dimasukkan sebanyak 0,5 ml pada tabung reaksi pertama sebagai pengenceran 10^{-1} selanjutnya divortex supaya homogen dan diambil 0,5 ml untuk diencerkan kembali pada tabung reaksi kedua sebagai pengenceran 10^{-2} dan divortex supaya homogen. Proses dilanjutkan dengan prosedur yang sama sampai dengan pengenceran 10^{-5} . Selanjutnya dari setiap pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-4} diambil 0,5 ml untuk dikultur pada media TSA dengan metode Pour Plate. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu ruang selama 18-24 jam. Kemudian koloni yang ada dihitung untuk menentukan jumlah total bakteri. Perhitungan jumlah bakteri menggunakan metode TPC (Total Plate Count) dengan rumus sbb :

$$\text{Total bakteri} = \sum \text{koloni} \times \frac{1}{\text{pengenceran}} \times \frac{1}{\text{volume bakteri (mL)}} \times \frac{1}{\text{berat sampel (g)}} (\text{CFU/g})$$

Pengamatan Aktivitas Bakteri Proteolitik

Preparasi media proteolitik dilakukan dengan cara disiapkan 4 gr bubuk TSA dan ditambahkan sebanyak 2% *skim milk powder* dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah diisi 100 mL akuades. Larutan media dipanaskan menggunakan *microwave* dan diaduk hingga homogen. Kemudian media disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian media yang steril dipindahkan pada *waterbath* hingga digunakan. Jika terjadi proses hidrolisis kasein yang ada pada *skim milk powder*, akan terlihat zona bening di sekeliling koloni mikroba, sebaliknya bila tidak terjadi hidrolisis maka daerah di sekitar koloni tetap berwarna keruh. Berdasarkan data tersebut diperoleh dapat ditentukan nilai rasio protease dengan rumus yang digunakan dalam riset (Ginting *et al.*, 2020; Subagiyo & Djunaedi, 2012).

Indeks hidrolisis protein = diameter zona bening bakteri/diameter koloni bakteri.

Pengukuran Aktivitas Bakteri Amilolitik

Preparasi media Amilolitik dilakukan dengan cara disiapkan 4 gr bubuk TSA dan ditambahkan sebanyak 1% tepung singkong (Tapioka) dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah diisi 100 mL akuades. Larutan media dipanaskan menggunakan *microwave* dan diaduk hingga homogen. Kemudian media disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian media yang steril dipindahkan pada *waterbath* hingga digunakan. Pengamatan aktivitas amilolitik menggunakan larutan Iodine untuk melihat aktivitas positif dengan cara

menuangkan larutan Iodine pada permukaan cawan untuk menunjukkan adanya zona hidrolisis (Ginting et al., 2021). Cara menghitung indeks hidrolisis amilum yaitu :

Indeks hidrolisis amilum = diameter zona bening bakteri/diameter koloni bakteri.

Pengukuran Aktivitas Bakteri Lipolitik

Preparasi media lipolitik dilakukan dengan cara disiapkan 100ml akuades, lalu tambahkan 1% minyak zaitun, 1% *Gum arabic*, 0,5% CaCl_2 lalu diaduk pada suhu 100°C menggunakan *magnetic* dan *Hot plate stirer* selama 15 menit. Tambahkan bubuk TSA sebanyak 4 gr. Larutan media dipanaskan menggunakan *microwave* dan diaduk hingga homogen. Kemudian media disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian media yang steril dipindahkan pada *waterbath* hingga digunakan (Simamora & Sukmawati, 2020) yang dimodifikasi. Cara menghitung indeks hidrolisis lemak yaitu (Rizky et al., 2017)

Indeks hidrolisis lemak = diameter zona bening bakteri/diameter koloni bakteri.

Pengukuran Aktivitas Bakteri Selulitik

Preparasi media selulolitik dilakukan dengan cara disiapkan 4 gr bubuk TSA dan ditambahkan sebanyak 1% *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC). Lalu ditambahkan sebanyak 100mL akuades dan aduk menggunakan *magnetic stirer* dan panaskan dengan suhu 100°C selama 15 menit. Kemudian media disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian media yang steril dipindahkan pada *waterbath* hingga digunakan. Pengamatan aktivitas selulolitik dilakukan dengan menambahkan *Congored* 0,1% pada seluruh permukaan media CMC untuk menunjukkan adanya zona hidrolisis. Pengukuran aktivitas bakteri selulitik dengan rumus (Nursyirwani et al., 2020).

Indeks hidrolisis selulose = diameter zona bening bakteri/diameter koloni bakteri.

Identifikasi Bakteri

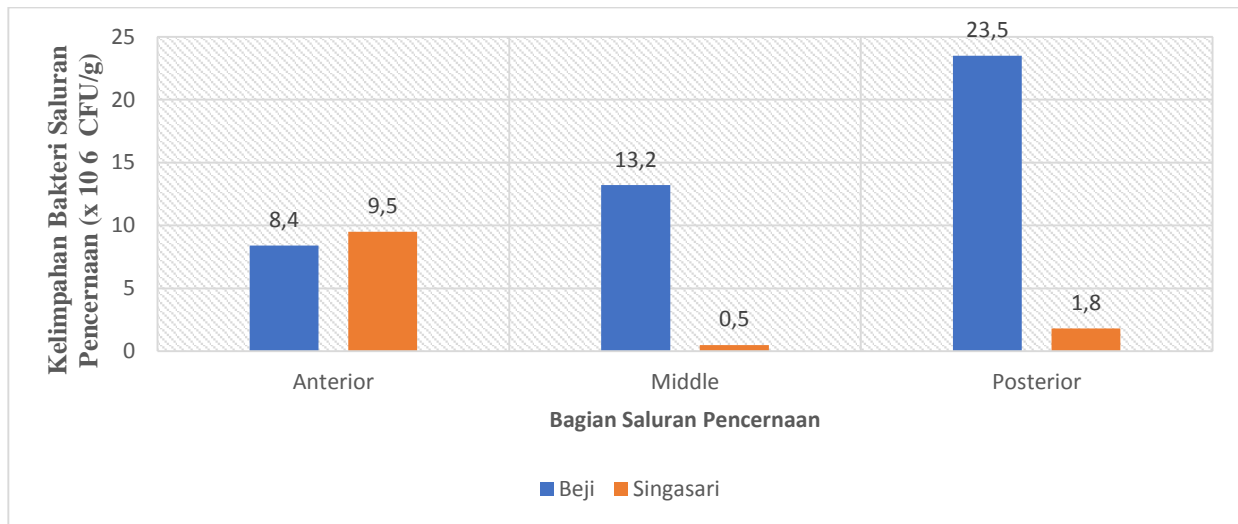
Identifikasi bakteri hidrolitik dilakukan pada bakteri yang memiliki aktivitas tergolong tinggi. Tahapan identifikasi diawali dengan isolasi DNA bakteri. Isolasi DNA bakteri dilakukan menggunakan kit genomic tissue (Geneaid) dengan prosedur yang sesuai dengan petunjuk penggunaan. Bakteri dikultur pada media *Tryptone Soy Broth* (TSB) dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil kultur bakteri dari TSB diambil sebanyak 1 mL dipindahkan ke dalam *microtube* 1,5 mL. Bakteri dicuci dari media dengan cara bakteri yang telah di pindah pada tube divortex dan *spindown* kemudian supernatan diganti menggunakan akuades. Pencucian dilakukan sebanyak tiga kali. Selanjutnya pelet bakteri dihomogenkan dengan 200 μL *GT Buffer* dan 20 μL *Proteinase K*. Sampel diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit dengan menggunakan *waterbath*. Selama inkubasi, sampel dihomogenkan setiap 5 menit. Tahapan selanjutnya adalah sel lisis. Larutan *GBT Buffer* dimasukan pada ampel sebanyak 200 μL lalu di-vortex selama 10 detik. Sampel diinkubasi kembali pada suhu 60°C selama 20 menit. Tahapan selanjutnya adalah binding dan *washing* DNA. *Ethanol absolut* ditambahkan ke dalam sampel, vortex dan *spindown* masing-masing selama 10 detik. Selanjutnya *GS column* dipasangkan pada 2 ml *collection tube*. Sampel dipindahkan ke dalam *GS column* dan disentrifugasi pada 6.000 rpm selama 2 menit. *GS column* dipindahkan ke 2 mL *collection tube* yang baru. Sebanyak 400 μL *WI Buffer* ditambahkan ke dalam *GS column* lalu disentrifugasi pada 6.000 rpm selama 30 detik. Sebanyak 600 μL *wash buffer* ditambahkan ke *GS column* lalu disentrifugasi pada 6.000 rpm selama 30 detik. Kemudian *GS column* disentrifugasi selama 3 menit pada 6.000 rpm untuk mengeringkan matriks *column*. Tahapan selanjutnya adalah elusi DNA. *GS-column* yang telah kering dipindahkan ke 1,5 *microtube* baru lalu ditambahkan 100 μL *Elution buffer* yang telah dihangatkan ke bagian tengah matriks *column*. Sampel didiamkan selama 5 menit untuk memastikan *Elution buffer* sepenuhnya terserap. Selanjutnya sampel disentrifugasi pada 6.000 rpm selama 30 detik. Sampel DNA disimpan pada suhu -20°C untuk dilakukan analisis pada tahap selanjutnya.

Amplifikasi dilakukan menggunakan Primus 25 Thermocycler PCR (*Peqlab*). Sepasang primer yang digunakan mengikuti penelitian Marchesi, et al. (1998) 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') dengan hasil amplifikasi berukuran 1500 bp. Mastermix PCR berisi sepasang primer, *nuclease free water* dan *my taq HS Redmix 2x* (DNA *polymerase*, *Buffer* MgCl_2 , dan dNTP) dengan volume masing-masing sesuai protokol My Taq HS Redmix. Program PCR yang digunakan untuk amplifikasi adalah predenaturasi 94°C selama 2 menit; diikuti 35 siklus: denaturasi 94°C selama 20 detik, *annealing* pada suhu 53°C selama 30 detik dan *extention* pada suhu 72°C selama 20 detik dan *final extention* pada suhu 72°C selama 5 menit serta suhu akhir 25°C . Hasil PCR dilihat dengan visualisasi gel elektroforesis dengan panjang pita 1500bp. Selanjutnya, dari hasil PCR yang berhasil kemudian dilakukan sekuensing untuk mendapatkan informasi urutan basa nukleotida. Data yang didapatkan berupa sekuen fasta yang kemudian di analisis BLAST untuk melihat homologi sekuen sampel dengan database NCBI.

HASIL DAN PEMBAHASAN

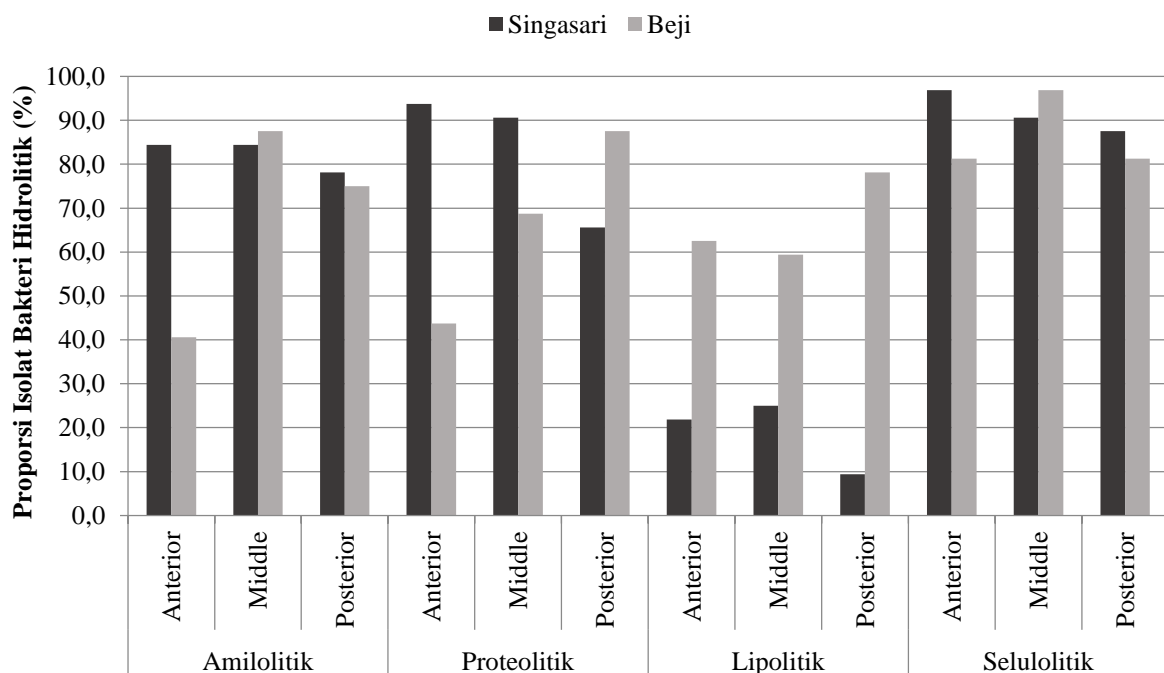
Hasil

Kelimpahan bakteri di dalam saluran pencernaan dapat dihitung berdasarkan metode *Total Plate Count* (TPC) (Nurhafid et al., 2021). Metode *Total Plate Count* (TPC) memiliki prinsip yaitu menentukan besarnya populasi bakteri yang terdapat pada saluran pencernaan ikan. Pengenceran yang digunakan dalam metode *Total Plate Count* (TPC) adalah 10^{-2} sampai 10^{-4} dan hasil perhitungan kelimpahan bakteri dengan satuan *Colony Form Unit* (CFU)/gram. Koloni bakteri yang tumbuh dalam TSA dihitung pada rentang 30–300 koloni. Sampel ikan Nilem diambil dari dua tempat yang memiliki perbedaan sistem pemeliharaan dan lokasi. Sampel berasal dari Balai Benih Ikan Singasari dan pembudidaya ikan di desa Beji. Hasil perhitungan ditampilkan pada Gambar 1.



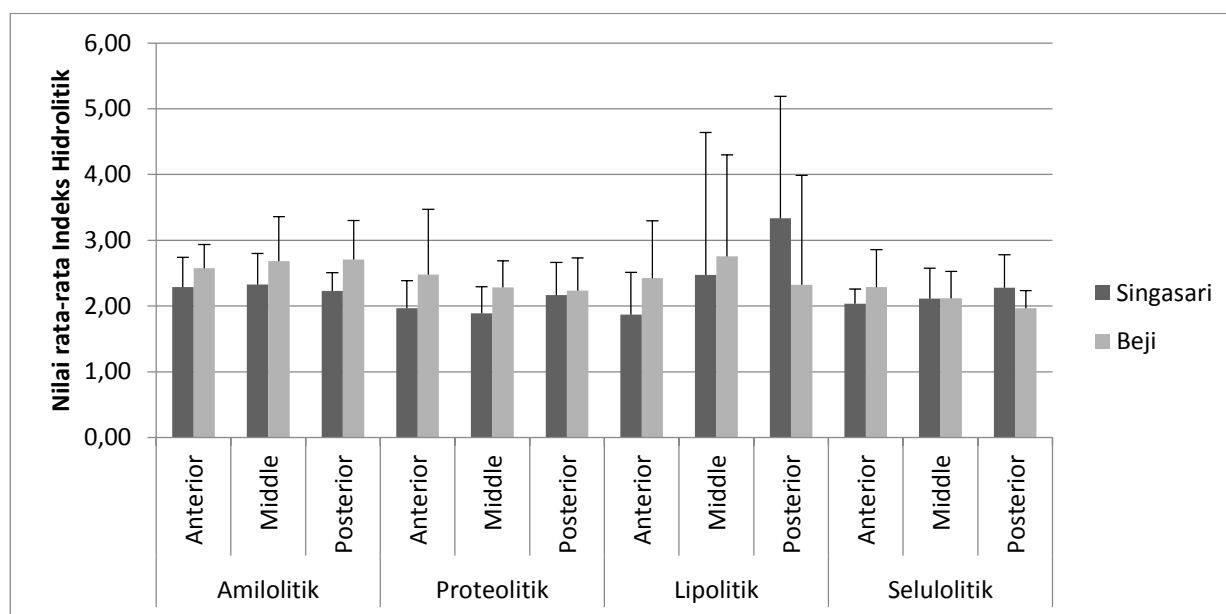
Gambar 1. Kelimpahan bakteri saluran pencernaan ikan Nilem per bagian (*anterior, middle, posterior*) yang dibudidayakan di Kabupaten Banyumas.

Berdasarkan Gambar 1. Tiga bagian pencernaan cenderung mengalami peningkatan pada bagian posterior untuk sampel yang berasal dari desa beji namun kelimpahan bervariasi untuk sampel dari desa singasari. Kelimpahan bakteri pada penelitian ini, kelimpahan bakteri saluran pencernaan ikan dari Beji menunjukkan kelimpahan meningkat ke arah bagian posterior, berturut-turut $8,4 \times 10^6$ CFU/g, $13,2 \times 10^6$ CFU/g dan $23,5 \times 10^6$ CFU/g. Sedangkan kelimpahan bakteri saluran pencernaan ikan dari Singasari bagian anterior sebanyak $9,5 \times 10^6$ CFU/g, bagian *middle* $0,5 \times 10^6$ CFU/g dan bagian posterior $1,8 \times 10^6$ CFU/g.



Gambar 1. Proporsi Isolat Bakteri Proteolitik, Amilolitik, Lipolitik, atau Selulolitik dari Usus Bagian Anterior, Middle, dan Posterior Ikan Nilem (*Osteochilus vittatus*) yang Dibudidayakan di Kabupaten Banyumas.

Isolat bakteri hidrolitik berhasil diisolasi dari setiap bagian usus ikan Nilem dari Singasari dan Beji. Berdasarkan lokasi pengambilan sampel, proporsi bakteri hidrolitik secara umum menunjukkan pola menurun ke bagian posterior usus ikan dari Singasari. Sedangkan proporsi bakteri hidrolitik lokasi Beji menunjukkan pola bervariasi di setiap bagian usus ikan. Meski demikian, berdasarkan gambar 2 keberadaan bakteri hidrolitik tertentu dapat diketahui lebih mendasar. Misalnya keberadaan bakteri selulolitik dari kedua lokasi menunjukkan keberadaan relative tinggi dibandingkan dengan keberadaan bakteri hidrolitik lainnya. Namun hasil penelitian ini menunjukkan bahwa keberadaan bakteri lipolitik dari lokasi Singasari didapatkan proporsi yang rendah dibandingkan keberadaan dari lokasi Beji. Kemudian bakteri amilolitik dan proteolitik secara umum menunjukkan proporsi relative tinggi di setiap bagian usus ikan namun relative bervariasi berdasarkan pengambilan dari lokasi Beji.



Gambar 2. Nilai rata-rata indeks aktivitas hidrolitik bakteri usus ikan Nilem (*Osteochilus vittatus*) yang Dibudidayakan di Kabupaten Banyumas

Berdasarkan Gambar 3, nilai rata-rata indeks aktivitas bakteri hidrolitik bagian usus ikan menunjukkan nilai relative seragam. Hal tersebut dapat dilihat dari bakteri amilolitik, proteolitik dan selulolitik, berbeda dengan lipolitik yang menunjukkan indeks tinggi pada bagian posterior lokasi Singasari didapatkan nilai rata-rata indeks aktivitas yang sangat tinggi dibandingkan bagian anterior. Bakteri hidrolitik diseleksi berdasarkan aktivitas proteolitik, amilolitik, lipolitik dan selulolitik didapatkan sebanyak tujuh isolat dengan aktivitas tinggi. Bakteri hidrolitik terpilih di tampilkan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Isolat bakteri penghasil enzim ekstraselluler dan indeks hidrolisis tertinggi

Isolat	Indeks Hidrolitik			
	Proteolitik	Amilolitik	Lipolitik	Selulolitik
BA26P	4,4	-	-	2,5
BA31N	-	-	4,0	2,8
BA13N	4,0	-	4,6	1,8
SP31N	-	3,0	-	2,0
BA27N	-	2,2	1,4	3,3
SP22N	-	2,1	-	3,0
BA21N	-	-	1,8	3,8

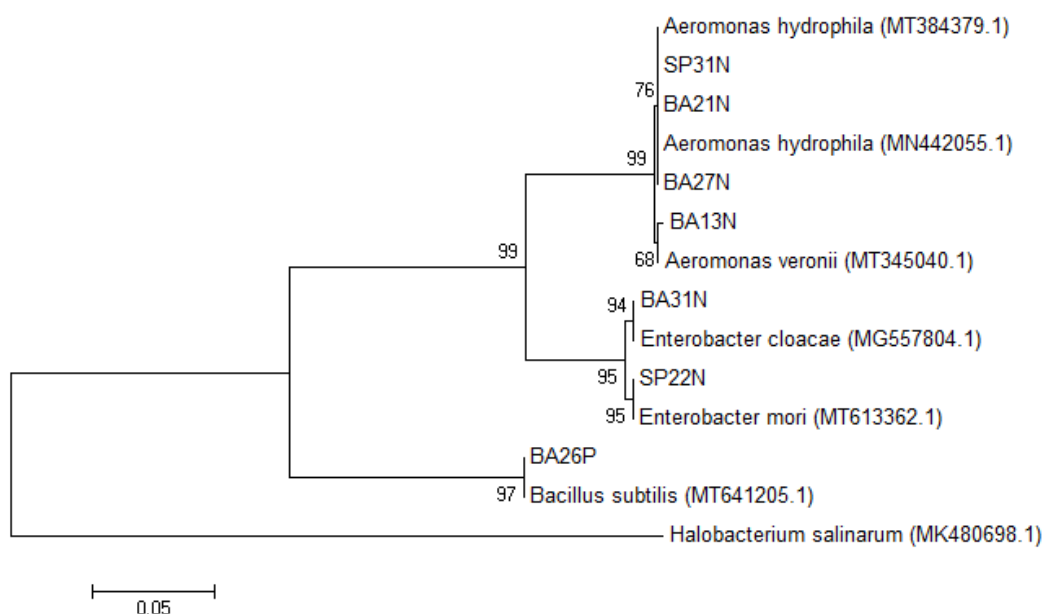
Keterangan: Pengukuran indeks hidrolisis diukur dengan satuan sentimeter (cm)

Hasil seleksi berdasarkan indeks hidrolitik, sebanyak tujuh isolat memiliki indeks tergolong tinggi. Sebagian besar bakteri yang menunjukkan hidrolitik tinggi berasal dari usus bagian anterior. Hidrolitik tertinggi didapatkan dari bakteri proteolitik sedangkan hidrolitik terendah didapatkan dari bakteri lipolitik. Kemudian tujuh isolate bakteri terpilih menunjukkan aktivitas selulolitik kemudian diikuti bakteri lipolitik sebanyak empat isolate, bakteri amilolitik tiga isolate dan bakteri proteolitik dua isolate.

Identifikasi bakteri hidrolitik dilakukan pada bakteri terpilih berdasarkan indeks hidrolisis tinggi. Identifikasi bakteri hidrolitik berdasarkan analisis blast sekuen gen 16s rDNA sampel dengan sekuen di GenBank untuk melihat similaritas. Hasil identifikasi ditampilkan pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Identifikasi bakteri hidrolitik saluran pencernaan ikan nilem

No	Isolat	Similaritas (%)	Species	Nomor Akses
1	BA26P	100	<i>Bacillus subtilis</i>	MT641205.1
2	BA31N	100	<i>Enterobacter cloacae</i>	MG557804
3	BA27N	99.80	<i>Aeromonas hydrophila</i>	MN442055.1
4	BA13N	99.47	<i>Aeromonas veronii</i>	MT345040
5	BA21N	100	<i>Aeromonas hydrophila</i>	MT384379.1
6	SP22N	100	<i>Enterobacter mori</i>	MT613362.1
7	SP31N	100	<i>Aeromonas hydrophila</i>	MT384379



Gambar 3. Pohon filogenetik bakteri bakteri hidrolitik berdasarkan sekuen 16s rDNA. Nomor akses NCBI ditampilkan dalam tanda kurung. Strain bakteri yang tidak memiliki nomor akses merupakan isolat sampel. Percabangan pada *Halobacterium salinarum* sebagai out-group.

Hasil *alignment* bakteri hidrolitik menunjukkan nilai similaritas yang sangat tinggi dengan spesies di GenBank yaitu 99,47-100%. Hasil identifikasi bakteri hidrolitik identik pada empat spesies berbeda, yaitu *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter mori*, *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas veronii*. Bakteri hidrolitik yang didapatkan diketahui memiliki sifat patogen dan nonpatogen pada ikan. Hasil konstruksi menunjukkan bahwa percabangan pohon terdiri dari tiga cabang besar yaitu *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Aeromonas* sp. Percabangan yang terbentuk menunjukkan percabangan yang stabil dengan nilai *bootstrap* tinggi yaitu 68-99%.

Pembahasan

Kelimpahan bakteri pada penelitian ini meningkat kearah bagian posterior pada pencernaan ikan dari Beji, namun didapatkan kelimpahan yang bervariasi pada bagian pencernaan ikan dari Singasari. Hasil penelitian Debasis *et al.*, (2012) mendapatkan kelimpahan bakteri saluran pencernaan meningkat kearah bagian posterior, namun pada ikan lainnya didapatkan kelimpahan bakteri saluran pencernaan menurun kearah posterior. Salah satu faktor yang mempengaruhi kelimpahan bakteri yaitu bahan organik atau sumber nutrisi dalam lingkungan. Menurut Marwan, *et al.* (2015), hubungan antara jumlah total bakteri dan jumlah organik total pada lingkungan perairan memiliki korelasi sebesar 92% dimana semakin tinggi jumlah bahan organik maka akan semakin tinggi jumlah bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa kelimpahan bakteri disuatu lingkungan berhubungan sumber nutrisi bakteri. Kelimpahan yang bervariasi antar bagian pencernaan diduga karena distribusi nutrisi yang bervariasi sehingga didapatkan kelimpahan

yang bervariasi. Secara keseluruhan, kelimpahan bakteri saluran pencernaan ikan nilam tergolong normal. Kelimpahan bakteri saluran pencernaan ikan nila ditemukan kelimpahan sebanyak $3,4 \times 10^8$ CFU/g dan kelimpahan bakteri saluran pencernaan ikan bandeng sebanyak $4,7 \times 10^6$ CFU/g (Al-Harbi dan Uddin, 2004; Debasis *et al.*, 2012). Penelitian Bairagi *et al.*, (2002) jumlah total bakteri dalam saluran pencernaan ikan mas mendapatkan kelimpahan $0,6 \times 10^6$ CFU/g.

Bakteri hidrolitik pada penelitian ini ditemukan disetiap bagian pencernaan dengan proporsi yang berbeda. Bakteri selulolitik didapatkan persentase relative tinggi disetiap bagian pencernaan. Hal ini karena ikan nilam memiliki kebiasaan makan herbivora dimana dalam penelitian ini diketahui bahwa ikan nilam yang dibudidaya diberi pakan tambahan berupa tumbuhan sente sehingga kandungan serat dalam pencernaan tinggi. Menurut Liu *et al.*, (2016) keberadaan bakteri selulolitik signifikan lebih tinggi pada ikan dengan kebiasaan makan tumbuhan (herbivora), namun sebaliknya, bakteri proteolitik signifikan lebih tinggi pada ikan dengan kebiasaan makan hewani (karnivora). Selain itu, kebiasaan makan ikan nilam yang herbivora akan mencari sumber pakan alami sebagai pakan tambahan berupa fitoplankton. Muryanto dan Sumarno, (2013) berdasarkan penelitiannya mengenai pengamatan kebiasaan makan ikan nilam hasil tangkapan di danau Talaga Sulawesi Tengah didapatkan bahwa jenis pakan ikan nilam berupa fitoplankton dan tumbuhan. Keberadaan bakteri lipolitik menunjukkan persentase terendah pada setiap bagian pencernaan. Berdasarkan penelitian Debasis *et al.*, (2012) kelimpahan bakteri lipolitik menunjukkan nilai kelimpahan terendah dari bakteri proteolitik, amilolitik dan selulolitik. Keberadaan bakteri proteolitik dan amilolitik pada penelitian ini menunjukkan bervariasi pada setiap bagian pencernaan. Keberadaan bakteri hidrolitik secara umum tersebar disetiap bagian pencernaan.

Berdasarkan hasil seleksi didapatkan tujuh isolat bakteri dengan indeks hidrolitik yang tinggi. Menurut Dar *et al.*, (2015) indeks hidrolisis bakteri dikategorikan tinggi jika mencapai rasio ≥ 3 , kategori sedang $\geq 1-2,9$ dan kategori rendah $0-0,9$. Seleksi bakteri hidrolitik bertujuan untuk mengetahui kemampuan dalam menghasilkan enzim ekstraselluler yang berpotensi sebagai kandidat probiotik. Menurut Yukgehnash *et al.*, (2020) bakteri yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim ekstraselluler yang menguntungkan dapat dikembangkan sebagai bakteri probiotik. Bakteri probiotik akuakultur memiliki kriteria, yaitu memiliki efek menguntungkan inang, antagonisme terhadap patogen dan stimulus kekebalan, mampu hidup dalam pencernaan, non-patogen, tidak resisten terhadap obat dan menghasilkan enzim ekstraselluler (Chauhan dan Singh, 2019).

Hasil identifikasi berdasarkan gen 16s rDNA dan konstruksi pohon filogenetik didapatkan tiga genus dari lima spesies berbeda yaitu *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophila* (3), *Aeromonas veronii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter mori*. Menurut Hagström *et al.*, (2000) identifikasi bakteri menggunakan urutan gen 16s rDNA dengan nilai similaritas lebih dari 97% maka menunjukkan bakteri dengan spesies yang sama. Hasil konstruksi pohon filogenetik menunjukkan percabangan yang tabil yaitu 76%-99% kecuali percabangan dari *Aeromonas veronii* menunjukkan percabangan mendekati stabil yaitu 68%. Menurut Fajriani *et al.*, (2018) percabangan dalam pohon filogenetik dikatakan stabil jika lebih dari 75%. *Bootstrap* merupakan metode untuk menguji tingkat kepercayaan set data model percabangan.

Tiga genus yang didapatkan dari penelitian ini diketahui bersifat patogen dan nonpatogen. *Bacillus subtilis* merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang yang banyak ditemukan diperairan sebagai bakteri non-patogen (Darafsh *et al.*, 2020; Nayak, 2021). *B. subtilis* diketahui memiliki potensi yang banyak dimanfaatkan sebagai agen probiotik akuakultur. *B. subtilis* diketahui memiliki potensi menghambat pertumbuhan patogen dengan metabolit sekunder yang dihasilkan berupa senyawa antibakteri. Studi penelitian menunjukkan terkait efek menguntungkan dari *B. subtilis* yaitu meningkatkan kesehatan ikan, menghasilkan enzim hidrolitik yang dapat membantu pencernaan inang. Probiotik *B. subtilis* banyak digunakan untuk meningkatkan produktifitas kegiatan akuakultur (Olmos, 2014).

Enterobacter sp merupakan bakteri Gram negatif yang ditemukan mendominasi di perairan. Efek dari keberadaan dan karakteristik *Enterobacter* sp. di perairan belum banyak di pelajari. Namun telah dilakukan penelitian oleh Zakaria *et al.*, (2019) *Enterobacter* sp. memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio harveyi*. Probiotik *Enterobacter* sp. diuji skala in vivo pada larva ikan kakap menunjukkan penurunan pada jumlah vibrio harveyi. Penelitian Abdel-Latif *et al.*, (2017) menemukan bahwa hasil isolasi bakteri dari organ dalam ikan nila sakit ditemukan bakteri *Enterobacter*, hasil uji menunjukkan *Enterobacter* menimbulkan kerusakan pada organ dalam ikan nila. Kajian mengenai karakteristik bakteri *Enterobacter* sp. perlu dipelajari lebih lanjut terkait peranan dan karakteristik dilingkungan perairan. *Aeromonas* sp. merupakan salah satu kelompok bakteri patogen oportunistik perairan tawar yang dapat menyebabkan kematian ikan hingga 100%. *Aeromonas hydrophila* dapat menimbulkan gejala luka dan warna kemerahan pada ikan. Baru-baru ini, patogen *A. hydrophila* terdeteksi menyerang empat kolam budidaya ikan nila di Kabupaten Minahasa Utara (Sinubu *et al.*, 2022). Selain lain, strain *Aeromonas veronii* memiliki virulen yang terdeteksi menyebabkan *epizootic ulcerative syndrome* (EUS) pada ikan di Bangladesh (Rahman *et al.*, 2002).

Berdasarkan bakteri yang didapatkan dari tiga genus yaitu *Bacillus* sp. *Enterobacter* sp. dan *Aeromonas* sp. merupakan bakteri yang umum menghuni usus ikan (Nurhafid *et al.*, 2021). Bakteri kelompok *Bacillus* sp. telah banyak dilakukan studi mengenai potensi yang sangat menguntungkan bagi ikan seperti *B. subtilis* (Darafsh *et al.*, 2020), *B.*

licheniformis (Das et al., 2014) *B. amyloliquefaciens* (Lee et al., 2015). Bakteri kelompok *Enterobacter* sp. diketahui sebagian studi menunjukkan sifat patogen bagi ikan dalam kondisi tertentu, namun beberapa studi juga menunjukkan kelompok bakteri ini dapat dijadikan sebagai agen biokontrol terhadap bakteri patogen (Al-Harbi & Uddin, 2004; Arief et al., 2010). Sedangkan kelompok *Aeromonas* sp. banyak dipelajari terkait infeksi terhadap ikan karena kelompok bakteri ini tergolong dalam bakteri patogen seperti *A. hydrophila* dan *A. veronii* (D. Zhang et al., 2020; D. X. Zhang et al., 2019). Meskipun demikian, kelompok bakteri yang ditemukan dalam penelitian ini diketahui berada dalam usus ikan sebagai penghuni usus ikan sehingga dapat berinteraksi dan selama keseimbangan populasi tetap seimbang akan menguntungkan bagi ikan.

KESIMPULAN

Bakteri hidrolitik ditemukan disetiap bagian pencernaan ikan nilam dengan proporsi dari keberadaan yang berbeda. Bakteri selulolitik ditemukan dengan keberadaan tertinggi disetiap bagian pencernaan, bakteri proteolitik dan amilolitik ditemukan bervariasi, dan bakteri lipolitik ditemukan dengan keberadaan terendah disetiap bagian pencernaan. Tujuh isolat bakteri hidrolitik yang ditemukan memiliki indeks hidrolitik tinggi teridentifikasi sebagai *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophila* (3), *Aeromonas veronii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter mori*. Bakteri hidrolitik yang didapat diketahui bersifat patogen dan nonpatogen dan diketahui sebagai bakteri normal dalam usus ikan

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Latif, H. M., Khalifa Sedeek, E., & Hany Abdel-Latif, C. M. (2017). Diversity of enterobacteriaceae retrieved from diseased cultured *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 29(January 2017), 29–34. www.fisheriesjournal.com
- Al-Harbi, A. H., & Uddin, M. N. (2004). Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 229(1–4), 37–44. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00388-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00388-0)
- Anggani, D., Rusliadi, R., & Putra, I. (2021). Penambahan Enzim Phytase pada Pakan Terhadap Pertumbuhan dan Kelulushidupan Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*) dengan Sistem Resirkulasi. *Ilmu Perairan (Aquatic ...)*, 9(3), 207–214. <https://jipas.ejournal.unri.ac.id/index.php/JIPAS/article/view/4685%0Ahttps://jipas.ejournal.unri.ac.id/index.php/JIPAS/article/download/4685/1702>
- Arief, M., Sulmartiwi, L., Prayogo, & Saputri, H. M. (2010). Isolasi Bakteri Indigen Sebagai Pendeградasi Bahan Organik Pada Media Pembenuhan Ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp.) Sistem Sirkulasi Tertutup. *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan*, 2(2), 117–122.
- Bairagi, A., Ghosh, K. S., Sen, S. K., & Ray, A. K. (2002). Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10(2), 109–121. <https://doi.org/10.1023/A:1021355406412>
- Chauhan, A., & Singh, R. (2019). Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. *Symbiosis*, 77(2), 99–113. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0580-1>
- Dar, M. A., Pawar, K. D., Jadhav, J. P., & Pandit, R. S. (2015). Isolation of cellulolytic bacteria from the gastrointestinal tract of *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) and their evaluation for cellulose biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 98, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.11.016>
- Darafsh, F., Soltani, M., Abdolhay, H. A., & Shamsaei Mehrejan, M. (2020). Improvement of growth performance, digestive enzymes and body composition of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) following feeding on probiotics: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Aquaculture Research*, 51(3), 957–964. <https://doi.org/10.1111/are.14440>
- Das, P., Mandal, S., Khan, A., Manna, S. K., & Ghosh, K. (2014). Distribution of extracellular enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of 4 brackish water fish species. *Turkish Journal of Zoology*, 38(1), 79–88. <https://doi.org/10.3906/zoo-1205-3>
- Debasis, D., Ghoshal, T. K., & Raja, R. A. (2012). *Short Communication Characterization of enzyme-producing bacteria isolated from the gut of Asian seabass, Lates calcarifer and milkfish, Chanos chanos and their application for nutrient enrichment of feed ingredients*. 1–8. <https://doi.org/10.1111/are.12099>
- Deepika, G., Sivakumar, P., & Rajan, M. R. (2019). *Isolation and Characterization of Bacteria from the Gut of Blue Gourami (Trichogaster trichopters) and its Role on Growth*. 13(December), 2479–2487.
- Fajriani, B., Budiharjo, A., & Pujiyanto, S. (2018). Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Antagonis Terhadap *Vibrio Parahaemolyticus* Patogen Pada Udang *Litopenaeus Vannamei* dari Produk Probiotik dan Sedimen Mangrove di Rembang. *Jurnal Biologi*, 7(1), 52–63.
- Ginting, E. L., Kemer, K., Wullur, S., & Uria, A. R. (2020). Identification of Proteolytic Thermophiles from Moinit Coastal Hot-Spring, North Sulawesi, Indonesia. *Geomicrobiology Journal*, 37(1), 50–58.

<https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1662524>

- Ginting, E. L., Wantania, L. L., Moko, E. M., Tumbol, R. A., Siby, M. S., & Wullur, S. (2021). Isolation and identification of thermophilic amylolytic bacteria from likupang marine hydrothermal, North Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas*, 22(6), 3326–3332. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220638>
- Hagström, Å., Pinhassi, J., & Li Zweifel, U. (2000). Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 21(3), 231–244. <https://doi.org/10.3354/ame021231>
- Khasani, I. (2010). Pemanfaatan Bioteknologi Berbasis Mikroorganisme Guna Mendukung Peningkatan Produktivitas Perikanan Nasional. *Media Akuakultur*, 5(1), 22. <https://doi.org/10.15578/ma.5.1.2010.22-31>
- Kurniasih, T., Lusiastuti, A. M., Azwar, Z. I., & Melati, I. (2013). *SEBAGAI UPAYA MENDAPATKAN KANDIDAT PROBIOTIK*. 99–109.
- Lee, Y., Lin, C., Lee, Y., Lin, C., Liu, F., & Huang, T. (2015). Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products ScienceDirect Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4), 836–844. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.02.003>
- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., & Wang, W. (2016). The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Scientific Reports*, 6(April), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24340>
- Marwan, A. H., Widyorini, N., & Nitisupardjo, M. (2015). Hubungan total bakteri dengan kandungan bahan organik total di muara sungai Babon, Semarang. *Diponegoro Journal of Maquares*, 4(3), 170–179.
- Muryanto, T., & Sumarno, D. D. (2013). Pengamatan Kebiasaan Makan Ikan Nilem (*Osteochilus Vittatus*) Hasil Tangkapan Jaring Insang Di Danau Talaga Kabupaten Donggala Provinsi Sulawesi Tengah. *Btl*, 11(1), 51–54.
- Nayak, S. K. (2021). Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis*. *Reviews in Aquaculture*, 13(2), 862–906. <https://doi.org/10.1111/raq.12503>
- Nurhafid, M., Syakuri, H., Oedjijono, O., Listiowati, E., Ekasanti, A., Nugrayani, D., & Pramono, H. (2021). Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Proteolitik dari Saluran Pencernaan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Dibudidayakan di Kabupaten Banyumas. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 23(2), 95. <https://doi.org/10.22146/jfs.64072>
- Nursyirwani, N., Feliatra, F., Tanjung, A., & Harjuni, F. (2020). Isolation of Cellulolytic Bacteria from Mangrove Sediment in Dumai Marine Station Riau and the Antibacterial Activity against Pathogens. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 430(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/430/1/012012>
- Olmos, J. (2014). *Bacillus subtilis* A Potential Probiotic Bacterium to Formulate Functional Feeds for Aquaculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 06(07), 361–365. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000169>
- Rahman, M., Colque-Navarro, P., Kühn, I., Huys, G., Swings, J., & Möllby, R. (2002). Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 650–655. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.650-655.2002>
- Rahmia, M., Putri, A., & Sugianti, Y. (2015). *Beberapa aspek Biologi Ikan Nilem (Osteochillus Vittatus) Di Danau Talaga , Sulawesi Tengah*. 7(2), 111–120.
- Rizky, M. Y., Fitri, R. D., Hastuti, U. S., & Prabaningtyas, S. (2017). Identifikasi Uji Kemampuan Hidrolisis Lemak Dan Penentuan Indeks Zona Bening Asam Laktat Pada Bakteri Dalam Wadi Makanan Traditional Kalimantan Tengah. *Jurnal Bionature*, 18(2), 87–98.
- Simamora, C. J. K., & Sukmawati, S. (2020). Identifikasi dan Karakterisasi Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Lipase Isolat Bakteri Lipolitik Lptk19 Asal Biji Karet. *Jurnal Ilmu Eksakta*, 12(1), 28–37.
- Sinubu, W. V., Tumbol, R. A., Undap, S. L., Manoppo, H., & Kreckhoff, R. L. (2022). Identifikasi bakteri patogen *Aeromonas* sp. pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Desa Matungkas, Kecamatan Dimembe, Kabupaten Minahasa Utara. *Budidaya Perairan*, 10(2), 109–120.
- Subagiyo, S., & Djunaedi, A. (2012). Skrining Kandidat Bakteri Probiotik dari Saluran Pencernaan Ikan Kerapu Berdasarkan Aktivitas Antibakteri dan Produksi Enzim Proteolitik Ekstraseluler. *ILMU KELAUTAN: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 16(1), 41–48. <https://ejournal.undip.ac.id/index.php/ijms/article/view/1844>
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., & Marimuthu, K. (2020). *Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish*. 1–25. <https://doi.org/10.1111/raq.12416>
- Yusra, Y., & Hatta, U. B. (2019). *SKRINING KANDIDAT BAKTERI PROBIOTIK DARI SALURAN PENCERNAAN IKAN NILA (Tilapia nilotica) BERDASARKAN AKTIFITAS PRODUKSI ENZIM*. November 2014.
- Zakaria, Z. H., Yaminudin, N. J. M., Yasin, I. S. M., Ikhsan, N. F. M., & Karim, M. M. A. (2019). Evaluation of enterobacter sp. strain G87 as potential probiont against vibrio harveyi infection in artemia nauplii and asian seabass (*lates calcarifer*) larvae. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 42(4), 1251–1262.

- Zhang, D. X., Kang, Y. H., Song, M. F., Shu, H. P., Guo, S. N., Jia, J. P., Tao, L. T., Zhao, Z. L., Zhang, L., Wang, C. F., Wang, G. Q., Qian, A. D., & Shan, X. F. (2019). Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from healthy Northern snakehead (*Channa argus*) in China. *Letters in Applied Microbiology*, 69(2), 100–109. <https://doi.org/10.1111/lam.13172>
- Zhang, D., Xu, D. H., Shoemaker, C. A., & Beck, B. H. (2020). The severity of motile *Aeromonas* septicemia caused by virulent *Aeromonas hydrophila* in channel catfish is influenced by nutrients and microbes in water. *Aquaculture*, 519(December 2019), 734898. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734898>