

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

AKTIVITAS PROTEOLITIK BAKTERI KANDIDAT PROBIOTIK DARI SALURAN PENCERNAAN UDANG JERBUNG, *Penaeus merguensis*

Diki Mulianto, Widyowati, Hendra Raharja, dan Anis Zubaidah[#]

Program Studi Akuakultur, Fakultas Pertanian dan Peternakan, Universitas Muhammadiyah, Malang
Jl. Raya Tlogomas No. 246, Tlogomas, Lowokwaru, Tegalondo, Kota Malang, Jawa Timur 65144

(Naskah diterima: 18 Oktober 2021; Revisi final: 1 April 2022; Disetujui publikasi: 4 April 2022)

ABSTRAK

Upaya untuk meningkatkan pemanfaatan protein dalam pakan dapat dilakukan dengan penambahan bakteri proteolitik. Penelitian ini bertujuan untuk skrining bakteri proteolitik pada saluran pencernaan udang Jerbung (*Penaeus merguensis*) sebagai kandidat probiotik. Skrining bakteri dilakukan dengan mengisolasi bakteri dari saluran pencernaan udang yang diperoleh dari tangkapan nelayan di pesisir pantai Pasuruan, Jawa Timur. Dari hasil isolasi diperoleh lebih dari 30 koloni yang tumbuh pada media, selanjutnya dipilih lima isolat yang dengan karakteristik morfologi yang berbeda. Lima isolat terpilih selanjutnya diuji aktivitas proteolitiknya pada media *skim milk agar* (SMA). Hasil penelitian menunjukkan aktivitas proteolitik terbesar pada isolat UD-1 dengan nilai aktivitas proteolitik sebesar $2,49 \pm 0,9$ cm; UD-2 sebesar $2,33 \pm 0,24$ cm; UD-3 sebesar $1,85 \pm 0,07$ cm; UD-4 sebesar $1,11 \pm 0,43$ cm; dan UD-5 sebesar $1,36 \pm 0,07$ cm. Tiga isolat dengan nilai aktivitas proteolitik tertinggi kemudian diuji pewarnaan gram, uji ketahanan terhadap kondisi asam (pH 3), uji penempelan bakteri, uji antagonistik terhadap bakteri *Vibrio harveyi*, uji patogenitas dan pengamatan pertumbuhan bakteri. Hasil uji pewarnaan gram dengan hasil gram positif pada ketiga isolat. Ketiga isolat mampu bertahan hidup pada kondisi asam (pH 3) selama delapan jam dengan nilai kepadatan (OD @ 620 nm) pada isolat tertinggi UD-1 (0,875). Uji antagonistic menunjukkan isolat UD-1, UD-2, dan UD-3 mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* dengan membentuk zona hambat di sekeliling isolat. Nilai antagonistik tertinggi pada isolat UD-1 sebesar 12,3 mm. Uji patogenitas yang dilakukan menunjukkan bahwa isolat tidak bersifat patogen pada udang budidaya. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa isolat (UD-1, UD-2, dan UD3) yang diisolasi dari saluran pencernaan udang termasuk bakteri proteolitik dan memenuhi syarat sebagai bakteri kandidat probiotik.

KATA KUNCI: bakteri proteolitik; uji antagonistik; uji patogenitas; uji perwarnaan gram; *Vibrio harveyi*

ABSTRACT: *Proteolytic activity of probiotic candidate bacteria from the digestive tract of the Banana shrimp (Penaeus merguensis). By: Diki Mulianto, Widyowati, Hendra Raharja, and Anis Zubaidah*

Efforts to increase the utilization of protein in feed can be made by adding proteolytic bacteria. This study aimed to screen proteolytic bacteria in the digestive tract of Banana shrimp (*Penaeus merguensis*) as probiotic candidates. The bacterial screening was carried out by isolating bacteria from the digestive tract of shrimp obtained from fishermen's catch on the coast of Pasuruan, East Java. From the isolation results, more than 30 colonies grew on the media, then five isolates were selected with different morphological characteristics. The five selected isolates were then tested for their proteolytic activity on Skim Milk Agar (SMA) media. The results showed the most excellent proteolytic activity in isolate UD-1 with a proteolytic activity value of 2.49 ± 0.9 cm; UD-2 is 2.33 ± 0.24 cm; UD-3 is 1.85 ± 0.07 cm; UD-4 is 1.11 ± 0.43 cm; and UD-5 is 1.36 ± 0.07 cm. The three isolates with the highest proteolytic activity values were tested for gram-positive staining, acid resistance test (pH 3), bacterial attachment test, antagonistic test against *Vibrio harveyi* bacteria, pathogenicity test, and bacterial growth observation. Gram stain test results with gram-positive results on the three isolates. The three isolates were able to survive in acidic conditions (pH 3) for eight hours with the highest density (OD @ 620 nm) value of UD-1 (0.875). The antagonistic test showed that isolates UD-1, UD-

[#] Korespondensi: Program Studi Akuakultur, Fakultas Pertanian dan Peternakan, Universitas Muhammadiyah, Malang.
Jl. Raya Tlogomas No. 246, Tlogomas, Lowokwaru, Tegalondo, Kota Malang, Jawa Timur 65144, Indonesia
E-mail: aniszubaidah@umm.ac.id

2, and UD-3 could inhibit the growth of *Vibrio harveyi* bacteria by forming an inhibitory zone around the isolates. The highest antagonistic value in the UD-1 isolate was 12.3 mm. The pathogenicity test carried out showed that the isolates were not pathogenic in cultured shrimp. Based on the study results, it can be concluded that the isolates (UD-1, UD-2, and UD-3) isolated from the shrimp's digestive tract are proteolytic bacteria and qualify as probiotic candidate bacteria.

KEYWORDS: proteolytic bacteria; *Vibrio harveyi*; antagonistic test; pathogenicity test; gram stain test

PENDAHULUAN

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan salah satu komoditas budidaya perikanan yang memiliki nilai ekonomis tinggi. Udang vaname di Indonesia mulai dibudidayakan sejak tahun 2001 sehingga sekarang menjadi primadona perikanan nasional. Namun hingga kini masih banyak tantangan pembudidaya untuk menghasilkan produksi yang maksimal (Lunes *et al.*, 2021). Pada tahun 2017 produksi udang vaname mengalami penurunan mencapai 20% menjadi 555,14 ton dari tahun 2016 dengan jumlah produksi 698,14 ton (Suriawan *et al.*, 2019). Selain ancaman penyakit yang masih tinggi penurunan produksi dapat pula diakibatkan oleh pengelolaan kualitas air yang kurang baik dan kurangnya tingkat pemanfaatan pakan (Liu *et al.*, 2021). Pada tambak intensif yang mengandalkan pakan buatan yang berlebih dan kualitas yang kurang baik sehingga dapat menyebabkan pencemaran media budidaya. Salah satu upaya untuk menjaga kualitas air budidaya yaitu dengan menggunakan probiotik yang dapat dicampurkan dengan pakan dan diaplikasikan langsung pada air budidaya (Ringø *et al.*, 2020). Menurut Ding *et al.* (2020), probiotik merupakan nutrisi tambahan yang terdiri atas mikroba hidup yang menguntungkan bagi hewan inangnya. Probiotik dapat meningkatkan nafsu makan, meningkatkan metabolisme, menghambat bakteri patogen, meningkatkan aktivitas kerja enzim, dan meningkatkan pertumbuhan (Newaj-Fizul & Austin, 2015; Falcinelli *et al.*, 2018; Van Doan *et al.*, 2019). Penggunaan probiotik dapat memberikan efek yang baik apabila sesuai dengan beberapa kriteria di antaranya spesies probiotik yang dimanfaatkan, metode yang digunakan, dosis pemberian, dan waktu pemberian (Ringø *et al.*, 2020).

Lebih dari 90% probiotik digunakan oleh para petambak udang untuk meningkatkan hasil budidayanya (Rico *et al.*, 2013). Probiotik dapat berperan dalam meningkatkan nilai pencernaan dengan menghasilkan enzim yang membantu proses pencernaan seperti amilase, lipase, dan protease. Keberadaan bakteri proteolitik penghasil protease pada saluran pencernaan udang bertujuan untuk mencerna substansi kompleks berupa protein dalam waktu yang sangat singkat (Kurniasih *et al.*, 2013). Enzim protease berfungsi untuk menghidrolisis pro-

tein menjadi senyawa sederhana, sehingga akan mudah terserap oleh tubuh dan akan meningkatkan laju pertumbuhan (Rohyati, 2015). Upaya untuk meningkatkan pertumbuhan pada udang dengan memanfaatkan bakteri proteolitik penghasil enzim protease yang dapat diperoleh dari saluran pencernaan.

Isolasi bakteri yang kandidat probiotik dari saluran pencernaan udang vaname telah dilakukan oleh Sarastiti *et al.* (2020) dan hasilnya memiliki kemiripan 99,93% dengan *Bacillus flexus*. Saat ini penelitian isolasi bakteri dari udang jerbung belum banyak dilakukan. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kandidat probiotik yang diisolasi dari udang jerbung (*Penaeus marginensis*) hasil tangkapan alam di perairan Pasuruan. Kandidat bakteri probiotik diharapkan memenuhi syarat sebagai probiotik dengan nilai aktivitas proteolitik yang tinggi, tahan terhadap kondisi asam, serta mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada bulan Mei-Juli tahun 2021 di Laboratorium Perikanan dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Malang (UMM). Analisis data dilakukan dengan metode analisis deskriptif. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah udang putih (*Penaeus marginensis*) yang diperoleh dari hasil tangkapan nelayan di pesisir pantai Pasuruan. Lima ekor sampel udang (bobot \pm 25 g) diambil ususnya untuk dihancurkan dan dilakukan pengenceran untuk ditebar pada media pertumbuhan dengan menggunakan teknik cawan sebar.

Semua alat yang digunakan disterilisasi pada autoklaf (Hirayama HVE-50) untuk membunuh mikroba yang hidup. Sampel diisolasi dari saluran pencernaan udang pada media *nutrien agar* (NA). Hasil isolasi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C kemudian dilakukan pengamatan morfologi meliputi bentuk, warna, elevasi, dan karakter optik (Sousa *et al.*, 2015). Lima isolat yang paling mendominasi (berdasarkan karakteristik morfologi bakteri) selanjutnya diuji proteolitik. Tiga isolat yang memiliki nilai proteolitik tertinggi selanjutnya diuji lanjut.

Pengujian aktivitas proteolitik dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat pada media *skim milk agar*

(SMA) menggunakan *cotton bud*, adanya zona bening yang terbentuk di sekeliling koloni menggunakan jangka sorong menandakan adanya aktivitas proteolitik (Suo *et al.*, 2021).

Uji ketahanan terhadap kondisi asam dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat pada media TSB yang telah diberi larutan pH buffer dengan pH 3 dan 7, selanjutnya disimpan pada *shaker* dengan suhu ruang selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri diamati dengan menggunakan metode pengukuran nilai *optical density* (OD λ 620 nm) pada spektrofotometer UV-Vis (Ayyash *et al.*, 2021).

Uji pertumbuhan bakteri dilakukan selama 14 jam dengan pengamatan nilai OD setiap dua jam sekali menggunakan media TSB yang dimodifikasi dari jurnal (Meyers *et al.*, 2018). Uji aktivitas antagonistik dengan mengamati zona hambat yang terbentuk di sekeliling koloni yang terdapat pada kertas cakram menggunakan bakteri patogen *Vibrio harveyi* yang dimodifikasi dari metode (Moussaid *et al.*, 2019).

Uji penempelan menggunakan media *triptic soy broth* (TSB), NaCl, dan substrat lempeng baja dengan melakukan pengukuran nilai OD yang telah dimodifikasi dari penelitian (Jankoviæ *et al.*, 2012). Lempeng baja yang digunakan disterilisasi dengan cara direndam pada larutan desinfektan selama 24 jam dan kemudian disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121° dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Sterilisasi tersebut dilakukan untuk mencegah adanya kontaminasi dari mikroorganisme lain yang menempel pada substrat tersebut. Lempeng baja dimasukkan pada masing-masing tabung reaksi yang berisikan 9 mL TSB dan telah terisi dengan masing-masing isolat dengan kepadatan 10^6 cfu/mL. Proses selanjutnya yakni melakukan inkubasi (suhu 37°C) dan di-*shaker* selama 24 jam. Memasukkan setiap lempeng baja pada pelarut NaCl fisiologis dan dilakukan pengukuran nilai OD pada spektrofotometer. Nilai OD menunjukkan jumlah banyak sedikitnya bakteri yang menempel pada substrat lempeng baja.

Uji pewarnaan gram dengan mengacu pada metode (Ako *et al.*, 2020). Uji patogenitas dilakukan pada udang vaname yang dibudidayakan pada akuarium dengan volume air sebanyak 36 L dengan kepadatan 15 ekor/akuarium. Pemeliharaan dilakukan selama 12 hari dengan pemberian pakan sehari sebanyak dua kali. Setiap akuarium diberi 10^{10} cfu/mL masing-masing isolat dan satu akuarium kontrol tanpa pemberian isolat (Pahlawi *et al.*, 2019).

HASIL DAN BAHASAN

Isolasi dilakukan untuk memisahkan bakteri satu dengan yang lainnya berdasarkan karakteristiknya

(Sousa *et al.*, 2015). Hasil dari isolasi pada media NA diperoleh lebih dari 30 koloni yang tumbuh, sehingga dipilih lima isolat yang memiliki karakteristik yang berbeda. Pemilihan isolat dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari hasil inokulasi didapatkan lima isolat bakteri dengan karakteristik morfologi yang berbeda, hasil pengamatan tersebut ditunjukkan pada Tabel 1. Kelima isolat tersebut selanjutnya dimurnikan dengan metode gores empat kuadran sebagai stok isolat murni. Isolat bakteri yang tumbuh pada media NA kemudian diinokulasi pada media SMA untuk dilakukan uji aktivitas proteolitik.

Hasil dari uji aktivitas proteolitik menunjukkan bahwa kelima isolat dapat tumbuh pada media SMA dan menghasilkan zona bening (memiliki aktivitas proteolitik). Hasil tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.

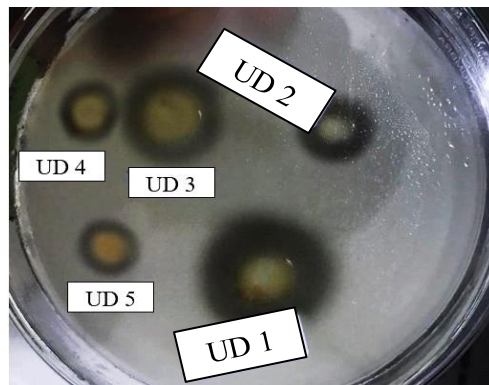
Dari kelima isolat selanjutnya dipilih tiga isolat yang memiliki nilai aktivitas proteolitik yang tinggi. Isolat tersebut di antaranya yaitu UD-1, UD-2, dan UD-3. Nilai aktivitas yang tertinggi yaitu pada isolat UD-1 sebesar $2,49 \pm 0,9$ cm. Berdasarkan hasil inokulasi diperoleh bahwa isolat yang tumbuh pada media SMA mampu membentuk zona bening yang menandakan isolat tersebut mampu mendegradasi protein. Zona bening yang terbentuk di sekeliling isolat menandakan adanya aktivitas protease ekstraseluler (Suo *et al.*, 2021). Diameter zona bening setiap isolat berbeda-beda tergantung dari kemampuan setiap isolat menghasilkan protease ekstraseluler untuk menghidrolisis protein di luar sel. Menurut Colantuono *et al.* (2020), semakin besar zona bening yang terbentuk di sekeliling isolat maka kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim protease semakin baik. Dari hasil pengukuran aktivitas proteolitik (Gambar 1) didapatkan lima isolat dengan nilai aktivitas proteolitik tertinggi yaitu isolat UD-1, UD-2, dan UD-3. Selanjutnya ketiga isolat tersebut dilakukan uji lanjut sebagai syarat bakteri kandidat probiotik.

Hasil dari uji ketahanan asam (pH 3) dan kontrol (pH 7) pada isolat UD-1, UD-2, dan UD-3 yang dilakukan pengukuran nilai OD dengan panjang gelombang 620 nm dapat dilihat pada Gambar 3.

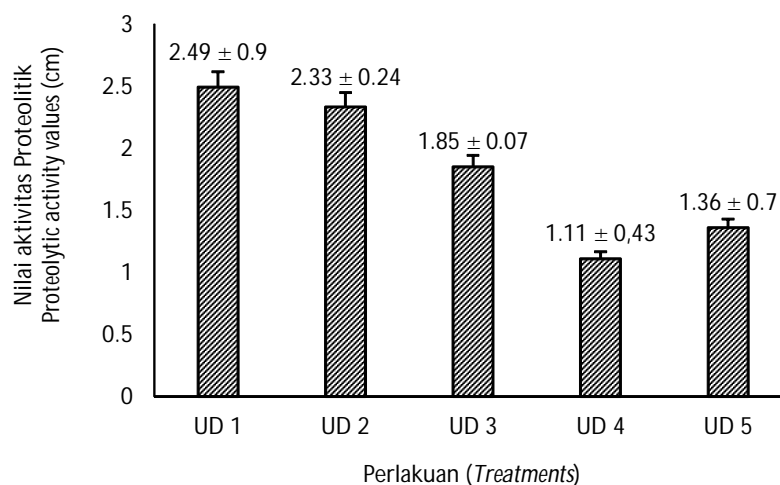
Saluran pencernaan udang pada umumnya memiliki pH asam (Kim *et al.*, 2021), untuk itu, isolat kandidat probiotik dilakukan uji menggunakan pH asam (pH 3) dan (pH 7) (Ayyash *et al.*, 2021). Menurut Kim *et al.* (2021), saluran pencernaan udang memiliki suasana pH asam yaitu pada kisaran pH 2-3. Pada Gambar 3 dapat diketahui dari ketiga isolat tersebut memiliki nilai OD tinggi, yang menandakan bakteri dapat tumbuh pada kondisi asam. Menurut Mohamad *et al.*

Tabel 1. Morfologi koloni bakteri hasil isolasi dari usus udang
 Table 1. The morphology of bacterial colonies isolated from shrimp intestines

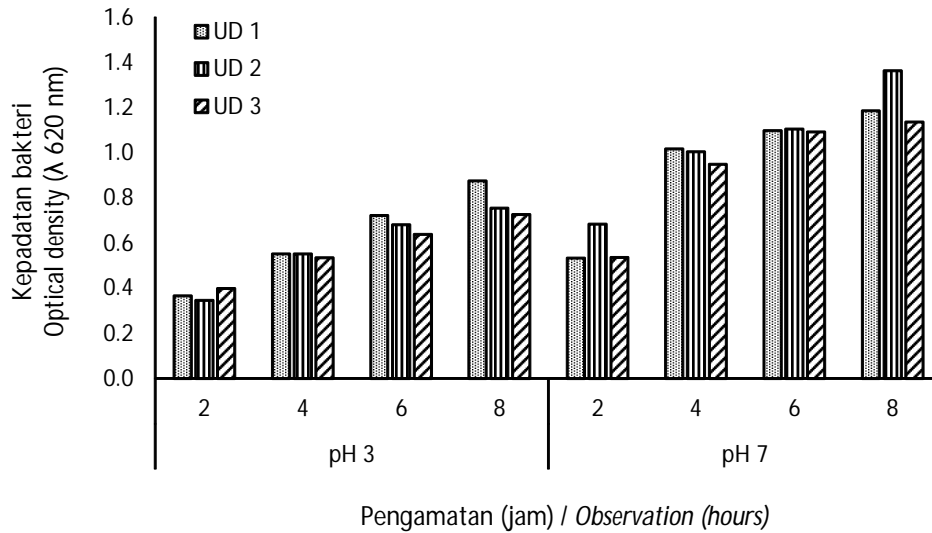
Isolat <i>Isolates</i>	Warna <i>Color</i>	Bentuk <i>Shape</i>	Elevasi <i>Elevation</i>	Tepian <i>Edge</i>	Karakteristik optik <i>Optical characteristics</i>
UD-1	Putih <i>White</i>	Tidak teratur <i>Irregular</i>	Cembung <i>Convex</i>	Seluruh <i>Entire</i>	Tembus cahaya <i>Translucent</i>
UD-2	Krem <i>Beige</i>	Bundar <i>Circular</i>	Naik <i>Raised</i>	Bergelombang <i>Undulate</i>	Tembus cahaya <i>Translucent</i>
UD-3	Krem <i>Beige</i>	Tidak teratur <i>Irregular</i>	Naik <i>Raised</i>	Seluruh <i>Entire</i>	Tidak tembus cahaya <i>Not translucent</i>
UD-4	Krem <i>Beige</i>	Bundar <i>Circular</i>	Datar <i>Flat</i>	Seluruh <i>Entire</i>	Tidak tembus cahaya <i>Not translucent</i>
UD-5	Putih <i>White</i>	Tidak teratur <i>Irregular</i>	Datar <i>Flat</i>	Filamen <i>Filamen</i>	Tembus cahaya <i>Translucent</i>



Gambar 1. Aktivitas proteolitik isolat pada media SMA (skala 4:5).
 Figure 1. Proteolytic activity of isolates on skim milk agar media.



Gambar 2. Nilai aktivitas proteolitik.
 Figure 2. Proteolytic activity values.



Gambar 3. Grafik pengukuran OD pada media pH 3 dan pH 7.
 Figure 3. Graph of optical density measurement on pH 3 and pH 7.

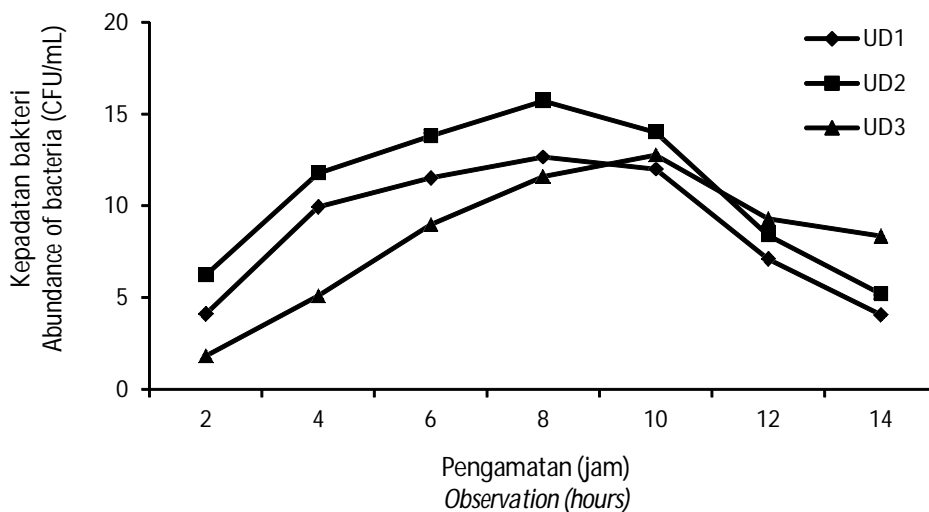
(2012), kriteria bakteri sebagai kandidat probiotik salah satunya harus dapat hidup pada kondisi asam.

Hasil dari uji pertumbuhan bakteri yang dilakukan selama 14 jam dengan pengukuran nilai OD dua jam sekali dapat dilihat pada Gambar 4.

Uji pertumbuhan dilakukan pada ketiga isolat UD-1, UD-2, dan UD-3. Uji pertumbuhan dilakukan untuk mengetahui waktu yang tepat pertumbuhan optimal dari setiap isolat. Pengamatan pertumbuhan bakteri dilakukan di setiap dua jam sekali selama 20 jam dengan melakukan pengukuran nilai OD (620 nm) untuk mengetahui fase pertumbuhan dari masing-masing isolat. Setelah mengetahui nilai OD setiap isolat,

selanjutnya nilai tersebut dimasukkan dalam persamaan kurva standar. Penggunaan kurva standar dilakukan karena dengan metode ini maka dapat mengetahui jumlah sel bakteri secara tidak langsung. Kurva standar tersebut diperoleh dengan meregresikan antara nilai OD dengan jumlah TPC. Berdasarkan analisis nilai regresi dapat diketahui bahwa nilai OD dengan jumlah TPC memiliki pola yang linier. Pola tersebut terbentuk berdasarkan persamaan yaitu pada:

Isolat UD1 $Y = 13,525x - 3,579$
 Isolat UD2 $Y = 16,883x - 5,3473$
 Isolat UD3 $Y = 11,883x - 1,2795 \dots 1)$



Gambar 4. Grafik pertumbuhan bakteri.
 Figure 4. Bacterial growth graph.

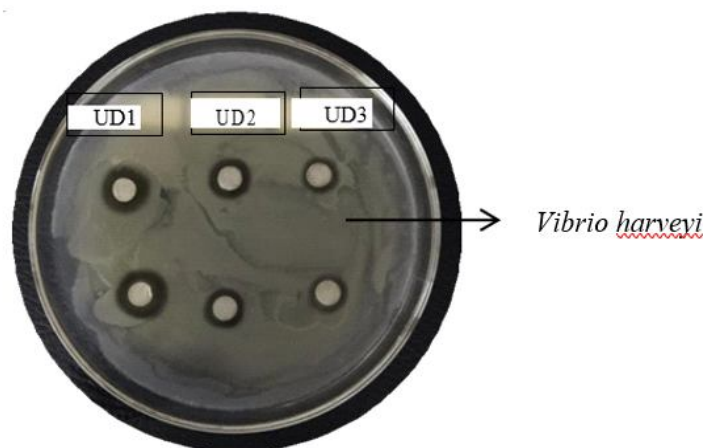
Berdasarkan persamaan tersebut maka akan lebih mudah dalam penghitungan jumlah sel bakteri terhadap nilai OD. Berdasarkan grafik pertumbuhan (Gambar 4) ketiga isolat mengalami fase penyesuaian pada lingkungan baru sangat cepat. Ketiga isolat tersebut mengalami fase eksponensial di mulai dari jam ke-2 hingga jam ke-8. Isolat UD-1 dan UD-2 mengalami fase stasioner di antara jam ke-8 dan ke-9. Isolat UD-3 fase stasioner terjadi di antara jam ke-9 dan ke-10. Kemudian kurva ketiga isolat tersebut menunjukkan penurunan yang berarti fase kematian. Pertumbuhan bakteri dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya yaitu pH, nutrisi, dan suhu (Setyati *et al.*, 2015). Menurut Rolfe *et al.* (2012), kurva pertumbuhan menunjukkan adanya aktivitas pertumbuhan ataupun pembelahan sel suatu mikroorganisme yang diawali dengan fase pertumbuhan dan diakhiri dengan fase kematian.

Bakteri yang digunakan pada uji antagonisitas yaitu bakteri *Vibrio harveyi*. Bakteri ini merupakan bakteri patogen yang umum menyerang pada budidaya udang vaname. Infeksi bakteri vibrio akan menyebabkan udang stres dan bahkan mengalami kematian massal. Uji terhadap bakteri patogen ini dimaksudkan untuk mengetahui kemampuan dari setiap isolat untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Aktivitas menghambat yang ditunjukkan oleh bakteri kandidat probiotik ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekeliling isolat (Moussaid *et al.*, 2019). Dari pengukuran zona hambat yang terbentuk di sekeliling koloni isolat bakteri diperoleh zona hambat pada isolat UD-1 sebesar 12,3 mm; isolat UD-2 sebesar 9,9 mm dan isolat UD-3 sebesar 5,5 mm. Hasil tersebut berdasarkan pemilihan zona hambat terbesar di masing- masing isolat. Semakin luas area zona hambat yang terbentuk hal tersebut menunjukkan bahwa isolat tersebut menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan baik (Nopitawati, 2010). Zona

hambat yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 5. Bakteri kandidat probiotik mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan memproduksi antibiotik, asam organik tertentu, membentuk produk bakteriosin, dan dapat menekan jumlah populasi bakteri lain (Wijayanto, 2015). Nilai zona hambat dari ketiga isolat yang memiliki nilai tertinggi yaitu isolat UD-1 sebesar 12,3 mm Davis & Stout (1971). Zona hambat dengan diameter > 20 mm dikategorikan sangat kuat, diameter 10-20 mm kategori kuat, diameter 5-10 mm dikategorikan sedang, dan diameter < 5 dikategorikan daya hambatnya lemah.

Uji penempelan bakteri dilakukan untuk mengetahui kemampuan setiap isolat untuk menempel pada epitel usus udang dan bersaing dengan bakteri lainnya ataupun malah terbuang bersamaan dengan sisa makanan (Mohamad *et al.*, 2012). Uji ini dilakukan dengan menggunakan substrat lempeng baja. Pemilihan substrat tersebut berdasarkan dari komposisi penyusun yang merupakan bahan yang tidak mudah korosif sehingga tidak akan memengaruhi hasil dari uji penempelan ini.

Berdasarkan dari uji tersebut dapat diketahui kemampuan dari setiap isolat untuk menempel pada substrat yang ditunjukkan pada nilai OD yang berbeda-beda. Dari Tabel 2, dapat diketahui dari ketiga isolat tersebut terdapat satu isolat yang memiliki nilai OD tertinggi yaitu isolat UD-1 dengan nilai absorbansi 0,971 yang berarti isolat tersebut memiliki kemampuan menempel paling baik dibandingkan dengan yang lainnya. Ada dua sifat bakteri untuk menempel yaitu autoagregasi (membentuk koloni dengan *strain* yang sejenis) dan koagregasi (membentuk agregat dengan *strain* bakteri yang berbeda), sifat autoagregat sangat penting untuk probiotik dapat berkolonisasi dan bertahan pada saluran pencernaan (Jankovi *et al.*, 2012).



Gambar 5. Zona hambat terhadap bakteri patogen.
Figure 5. Zone of inhibition against pathogenic bacteria.

Tabel 2. Nilai OD dan TPC uji penempelan
 Table 2. OD and TPC values of attachment test

Isolat <i>Isolates</i>	Absorbansi (<i>Absorbance</i>) (620 nm)	Kemampuan penempelan <i>Attachment ability</i> (CFU/mL)
UD-1	0.971	15.3 x 10 ²
UD-2	0.131	8.4 x 10 ²
UD-3	0.872	12.9 x 10 ²

Uji pewarnaan gram dilakukan pada setiap isolat untuk mengetahui bakteri kandidat probiotik tersebut termasuk gram positif ataupun negatif. Hasil uji pewarnaan gram dapat dilihat pada Tabel 3.

Uji pewarnaan gram yang dilakukan pada setiap masing-masing isolat menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut termasuk bakteri gram positif (Tabel 3). Hasil tersebut menunjukkan bahwa setiap isolat merupakan bakteri gram positif karena menunjukkan warna ungu (Rahmiati & Mumpuni, 2017). Bakteri gram positif berwarna ungu karena bakteri tersebut mampu mempertahankan warna dari kristal violet yang menandakan bakteri tersebut memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal.

Hasil uji patogenitas tidak menunjukkan gejala klinis yang buruk, pengamatan gejala klinis dapat dilihat pada Tabel 4.

Uji patogenitas dilakukan untuk mengetahui masing-masing isolat bersifat patogen terhadap inang sehingga dapat menyebabkan sakit ataupun kematian (Pahlawi *et al.*, 2019). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa udang dalam kondisi sehat, hal ini dapat dilihat dari nafsu makan udang yang baik, pergerakan lincah, tidak terdapat luka di badan dan tidak ada kematian

udang. Hasil ini juga membuktikan bahwa bakteri kandidat probiotik yang diisolasi dari usus udang jerbung tidak bersifat patogen dan telah memenuhi persyaratan sebagai kandidat probiotik (Verschuere *et al.*, 2000).

KESIMPULAN

Screening bakteri dari saluran pencernaan udang yang dapat menghasilkan enzim protease didapatkan lima isolat yaitu: UD-1, UD-2, UD-3, UD-4, dan UD-5. Berdasarkan uji yang dilakukan didapatkan tiga isolat (UD-1, UD-2, dan UD-3) yang telah memenuhi syarat sebagai kandidat probiotik.

UCAPAN TERIMA KASIH

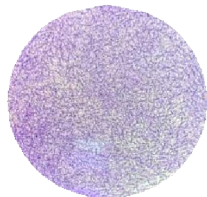
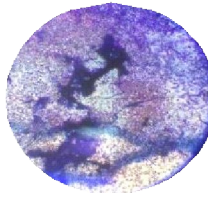
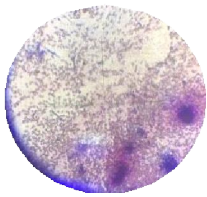
Terima kasih diucapkan pada Dirjen Dikti Kemendikbud Ristek yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Kreatifitas Mahasiswa (PKM-RE).

KONTRIBUSI PENULIS

Penulis Satu menyiapkan naskah (manuskrip) dan persiapan; Penulis Dua melakukan percobaan; Penulis Tiga melakukan percobaan dan analisis data 3; Penulis Empat melakukan arahan riset, desain percobaan, dan penyelesaian naskah.

Tabel 3. Pewarnaan gram pada setiap isolat
 Table 3. Gram stain on each isolate

Isolat <i>Isolates</i>	UD-1	UD-2	UD-3
	(+)	(+)	(+)
Gram	Gram positif <i>Positive gram</i>	Gram positif <i>Positive gram</i>	Gram positif <i>Positive gram</i>

Gambar <i>Figure</i>			
-------------------------	---	---	---

Tabel 4. Pengamatan gejala klinis udang yang dipelihara pada media yang mengandung bakteri kandidat probiotik

Table 4. Observation of clinical symptoms of shrimp reared in media containing candidate probiotic bacteria

Parameter Parameters	UD-1	UD-2	UD-3
Pergerakan (<i>Movement</i>)	+++	+++	++
Nafsu makan (<i>Apetite</i>)	+++	+++	++
Luka di badan (<i>Body wounds</i>)	-	-	-
Kematian (<i>Mortality</i>)	-	-	-

Keterangan (*Note*):

- : tidak ada (*not*)
- + : sedikit/cukup (*fairly*)
- ++ : baik (*good*)
- +++ : sangat baik (*very good*)

DAFTAR ACUAN

- Ako, S.E., Akum, E.A., Nkenfou, C.N., Pokam, T.B., & Assob, J.C.N. (2020). Fecal gram stain morphotype and their distribution patterns in a Cameroonian cohort with and without HIV infection. *Scientific African*, 8, e00376, DOI:10.1016/j.sciaf.2020.e00376.
- Ayyash, M.M., Abdalla, A.K., AlKalbani, N.S., Baig, M.A., Turner, M.S., Liu, S-Q., & Shah, N.P. (2021). Invited review: Characterization of new probiotics from dairy and nondairy products-Insights into acid tolerance, bile metabolism and tolerance, and adhesion capability. *Journal of Dairy Science*, 104(8), 8363-8379. DOI: 10.3168/jds.2021-20398.
- Budiardi, T., Muzaki A., & Utomo, N.B.P. (2013). Produksi udang vaname (*Litopenaeus vaname*) di tambak biocrete dengan padat penebaran berbeda. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 4(2), 109-113.
- Colantuono, A., D'Incecco, P., Fortina, M.G., Rosi, V., Ricci, G., & Pellegrino, L. (2020). Milk substrates influence proteolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* strains. *Food Control*, 111, 107063.
- Davis, W.W. & Stout, T.R. (1971). Disc plate methods of microbiological antibiotic assay. *Microbiology* 22 (4): 659-665 doi: 10.1128/am.22.4.659-665.1971.
- Ding, S., Yan, W., Ma, Y., & Fang, J. (2020). The impact of probiotics on gut health via alternation of immune status of monogastric animals. *Animal Nutrition*, 7(1). DOI: 10.1016/j.aninu.2020.11.004.
- Falcinelli, S., Rodiles, A., Hatef, A., Picchietti, S., Cossignani, L., & Merrifield, D.L. (2018). Influence of probiotic administration on gut microbiota core. A review on the effect on appetite control, glucose and lipid metabolism. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 52, S50-S56.
- Jankoviæ, T., Frece, J., Abram, M., & Gobin, I. (2012). Ag-gregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Int. J. Sanitary Eng, Res.*, 6, 19-24.
- Kim, S., Jeon, H., Han, H., & Hur, J.W. (2021). Evaluasi *Bacillus albus* SMG-1 dan *B. safensis* SMG-2 yang diisolasi dari Danau Saemangeum sebagai probiotik untuk budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Laporan Budidaya*, 20, 100743.
- Kurniasih, T., Widanarni, Mulyasari, Melati, I., Azwar, Z.I., & Lusiastuti, A.M. (2013). Isolasi, seleksi, dan identifikasi bakteri dari saluran pencernaan ikan lele sebagai kandidat probiotik. *Jurnal Riset Akuakultur*, 8(2), 277-286.
- Liu, X., He, X., Huang, G., Zhou, Y., & Lai, J. (2021). Bioremediation by the mullet *Mugil cephalus* feeding on organic deposits produced by intensive shrimp mariculture. *Aquaculture*, 541, 736674.
- Lunes, R.S., Branco, P.C., Pressinotti, L.N., de Carvalho, R.A.D.L., & da Silva, J.R.M. (2021). Does the heterotrophic system influence the cellular immune response of *Litopenaeus vannamei* shrimp? In vitro phagocytosis indices and superoxide anion production comparisons. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 2, 100009.
- Meyers, A., Furtmann, C., & Jose, J. (2018). Direct optical density determination of bacterial cultures in microplates for high-throughput screening applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 118, 1-5.

- Mohamad, N., Manan, H., Sallehuddin, M., Musa, N., & Ikhwanuddin, M. (2020). Screening of lactic acid bacteria isolate from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) as potential probiotics. *Aquaculture Reports*, 18, 100523.
- Moussaid, F., Barnossi, A.E., Chahmi, N., & Housseini, A.I. (2019). Screening and selection of new microbial anti-Candida. *Materials Today: Proceedings*, 13, 1049-1054.
- Newaj-Fyzul, A. & Austin, B. (2015). Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *Journal of Fish Diseases*, 38, 937-955.
- Nopitawati, T. (2010). *Seleksi bakteri probiotik dari saluran pencernaan untuk meningkatkan kinerja pertumbuhan udang vaname (Litopenaeus vannamei)*. Tesis. Institut Pertanian Bogor.
- Pahlawi, I.M.H. & Satyantini, W.H. (2019). Pathogenicity test of *Pseudomonas* sp. in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a probiotic candidate. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 8(2), 92-98.
- Rahmiati, R. & Mumpuni, M. (2017). Eksplorasi bakteri asam laktat kandidat probiotik dan potensinya dalam menghambat bakteri patogen. *Elkawanie: Journal of Islamic Science and Technology*, 3(2), 141-150.
- Rico, A., Satapornvanit, K., Min, J., Shahabuddin, A.M., Henriksson, P.J.G., Murray, F.J., Little, D.C., Dalsgaard, A., & Van den Brink, P.J. (2013). Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*, 412-413, 231-243. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.07.028.
- Ringo, E., Van Doan, H., Lee, S.H., Soltani, M., Hoseinifar, S.H., Harikrishnan, R., & Song, S.K. (2020). Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: Interesting supplementation for aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 129, 116-136. <https://doi.org/10.1111/jam.14628>.
- Rohyati, I.S. (2015). Improved of growth rate of abalone *Haliotis asinina* fed pudding probiotic-enriched protein. *Procedia Environmental Sciences*, 23, 315-322.
- Rolfe, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A.D., Alston, M.,, & Baranyi, J. (2012). Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of Bacteriology*, 194(3), 686-701.
- Setyati, W.A., Martani, E., & Zainuddin, M. (2015). Kinetika pertumbuhan dan aktivitas protease isolat 36k dari sedimen ekosistem mangrove, Karimunjawa, Jepara. Indonesian. *Journal of Marine Sciences/Illmu Kelautan*, 20(3), 163-169.
- Sarastiti, S., Suminto, & Sarjito. (2020). Molecular identification bacteria as probiotic candidate isolated from intestinal tract of vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Pasir Laut*, 4(1), 9-15.
- Sousa, A.M., Pereira, M.O., & Lourenço, A. (2015). MorphoCol: An ontology-based knowledgebase for the characterisation of clinically significant bacterial colony morphologies. *Journal of Biomedical Informatics*, 55, 55-63.
- Suo, X., Huang, S., Wang, J., Fu, N., Jeantet, R., & Chen, X.D. (2021). Effect of culturing lactic acid bacteria with varying skim milk concentration on bacteria survival during heat treatment. *Journal of Food Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110396>.
- Suriawan, A., Efendi, S., Asmoro, S., & Wiyana, J. (2019). Sistem budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) pada tambak HDPE dengan sumber air bawah tanah salinitas tinggi di Kabupaten Pasuruan. *Jurnal Perikanan Budidaya Air Payau dan Laut*, 1(14), 6-14.
- Van Doan, H., Hoseinifar, S.H., Ringø, E., Esteban, M.Á., Dadar, M., & Dawood, M.A.O. (2019). Host-associated probiotics: A key factor in sustainable aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655-671.
- Wijayanto, N., Feliatra, F., & Nedi, S. (2015). Antagonism test of probiotics bacteria isolate from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) against pathogens (*Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp., and *Vibrio alginolyticus*). Disertasi. Universitas Riau. Jambi.