

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

SCREENING BAKTERI SELULOLITIK DAN AMIOLITIK PADA RUMEN SAPI SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK PADA BUDIDAYA IKAN SECARA *IN VITRO*

Anis Zubaidah[#], Dony Prasetyo, Hany Handajani, Sulis Puji Rohmah, dan Diah Ayu Puspita

Program Studi Akuakultur Fakultas Pertanian dan Peternakan, Universitas Muhammadiyah Malang
Kampus III, Gedung GKB 1 Lantai 5, Jl. Raya Tlogomas No. 246 Malang, Jawa Timur 65144

(Naskah diterima: 16 September 2019; Revisi final: 14 November 2019; Disetujui publikasi: 18 November 2019)

ABSTRAK

Bakteri selulolitik dan amilolitik mampu mengubah selulosa dan amilum menjadi glukosa serta mampu menghasilkan enzim selulase dan amilase. Bakteri selulolitik dan amilolitik diisolasi dari rumen sapi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan bakteri selulolitik dan amilolitik dari rumen sapi yang memiliki nilai indeks selulolitik dan amilolitik yang tinggi, serta mampu memenuhi syarat untuk dijadikan sebagai probiotik. *Screening* bakteri pada rumen sapi menghasilkan enam isolat yaitu AR, BR, CR, DR, ER, dan FR. Uji aktivitas selulolitik dilakukan pada substrat *carboxy methyl cellulose* (CMC) dan amilolitik pada amilum, uji ketahanan terhadap kondisi asam (pH 3), pengamatan pertumbuhan bakteri selama 30 jam, uji antagonistik terhadap bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*, uji penempelan bakteri dan uji patogenisitas bakteri pada ikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas selulolitik terbesar pada isolat AR ($2,67 \pm 0,35$ cm) dan aktivitas amilolitik terbesar pada isolat AR ($4 \pm 0,60$ cm). Hanya empat isolat (AR, BR, ER, dan FR) yang dilakukan uji lanjut. Keempat isolat mampu bertahan dalam kondisi asam pH 3 selama delapan jam dengan nilai kepadatan (OD) terbesar pada isolat ER (1.137). Uji antagonistik menunjukkan bahwa isolat AR, ER, dan FR mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Isolat FR memiliki nilai antagonistik terbesar yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat 17 mm. Uji penempelan bakteri untuk membuktikan bahwa isolat mampu menempel pada usus ikan. Uji patogenisitas pada isolat yang didapatkan guna membuktikan bahwa isolat tidak bersifat patogen terhadap inang. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa isolat yang didapatkan dari rumen sapi termasuk bakteri selulolitik dan amilolitik yang telah memenuhi syarat sebagai kandidat probiotik pada ikan.

KATA KUNCI: amilase; selulase; zona hambat

ABSTRACT: *In vitro screening of cellulolytic and amylolytic bacteria in cow rumen as probiotic candidates for fish culture. By: Anis Zubaidah, Dony Prasetyo, Hany Handajani, Sulis Puji Rohmah, and Diah Ayu Puspita*

*Cellulolytic and amylolytic bacteria can transform cellulose and starch into glucose and produce the cellulase and amylase enzymes. These types of bacteria can be found in and isolated from cow's rumen. Thus, the purpose of this study was to obtain potential cellulolytic and amylolytic bacteria from cow's rumen with a high cellulolytic and amylolytic index value and can be qualified as probiotics. The screening of bacteria in the cow's rumen produces six isolates i.e. AR, BR, CR, DR, ER, and FR. The parameters observed were: the cellulolytic activity in carboxymethyl cellulose (CMC) substrate, amylolytic activity on starch substrates, resistance test to acidic conditions (pH 3), bacterial growth for 30 hours, antagonistic to pathogenicity test to bacteria *Aeromonas hydrophila*, bacterial attachment test, and bacterial pathogenicity test in fish. The results showed that the largest cellulolytic and amylolytic activities were observed in AR isolates with a value of 2.67 ± 0.35 cm) and 4 ± 0.60 cm, respectively. Only four isolates (AR, BR, ER, and FR) were used in further tests. The four isolates were able to survive in the acidic conditions of pH 3 for 8 hours with the largest optical density (OD) value was achieved by ER isolates (1,137). The growth of each isolate was different. The antagonistic test showed that the three isolates could inhibit the growth of *A. hydrophila*. FR isolates had the greatest antagonistic values characterized by the formation of an inhibition zone of 17 mm. Bacteria attachment test proved*

[#] Korespondensi: Program Studi Akuakultur Fakultas Pertanian dan Peternakan, Universitas Muhammadiyah Malang. Kampus III, Gedung GKB 1 Lantai 5, Jl. Raya Tlogomas No. 246 Malang, Jawa Timur 65144, Indonesia.
Tel. + 62 341 464318
E-mail: aniszubaidah@umm.ac.id

that the isolates were able to stick in the fish gut. The pathogenicity tests also proved that the isolates were not pathogenic to the host.

KEYWORDS: *amylase; cellulose; inhibition zone*

PENDAHULUAN

Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang dapat menghasilkan enzim selulase sebagai respons terhadap adanya selulosa pada lingkungannya, serta memiliki kemampuan menghidrolisis selulosa menjadi glukosa (Baharuddin *et al.*, 2010). Sedangkan bakteri amilolitik merupakan bakteri yang dapat menghasilkan enzim amilase yang mampu memecah pati menjadi glukosa (Murtius, 2016). Proses tersebut dapat berlangsung apabila terjadi kontak langsung antara sel bakteri dengan substrat. Nilai pencernaan selulosa yang rendah dapat menyebabkan energi potensialnya tidak dimanfaatkan dengan baik dalam metabolisme ikan, begitu pula dengan amilum. Ikan memiliki perbedaan dengan hewan terestrial herbivora berdasarkan kemampuan untuk mendegradasi lignin selulosa dalam pencernaan makanannya (Mudasir *et al.*, 2015).

Bakteri selulolitik dan amilolitik dapat diisolasi dari rumen sapi. Rumen mengandung berbagai macam mikroorganisme hidup seperti bakteri yang berperan membantu proses pencernaan makanan. Rumen merupakan salah satu bagian pada lambung hewan ruminansia yang berfungsi sebagai tempat pencernaan makanan dengan proses fermentasi yang dilakukan oleh berbagai macam mikroorganisme seperti bakteri. Bakteri selulolitik dan amilolitik merupakan salah satu jenis bakteri yang hidup dalam rumen sapi karena mampu menghasilkan enzim ekstraseluler yang diperlukan untuk perombakan bahan organik. Menurut Lamid *et al.* (2006), rumen sapi merupakan bahan buangan sisa pakan yang tidak tercerna dengan berbagai macam jenis mikroba. Beberapa genus bakteri yang memiliki kemampuan selulolitik di antaranya *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Aeromonas* (Anand *et al.*, 2009) *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermomonospora*, *Cellulomonas*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Acetivibrio*, *Misrobispora*, dan *Streptomyces* yang mampu memproduksi enzim selulase secara efektif. Mikroorganisme tersebut dapat mendegradasi selulosa karena mampu menghasilkan enzim selulase yang memiliki spesifikasi berbeda dan kerja sama. Enzim tersebut menghidrolisis ikatan (1,4)- β -Dglukosa pada selulosa (Saratale *et al.*, 2012). Sedangkan beberapa genus mikroorganisme yang memiliki kemampuan amilolitik di antaranya adalah kapang, sedangkan contoh bakteri jenis amilolitik adalah *Clostridium butyricum* dan *Basilus subtilis* (Murtius, 2016). Pemanfaatan enzim selulase dan amilase yang diekstraksi dari bakteri sangat luas. Selain dalam

bidang pangan dan industri, juga dapat dimanfaatkan dalam bidang perikanan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan bakteri selulolitik dan amilolitik yang berasal dari cairan rumen sapi yang memiliki nilai indeks selulolitik dan amilolitik yang tinggi, tahan terhadap suasana asam, memiliki sifat antagonistik terhadap bakteri patogen, dapat menempel pada substrat, serta tidak bersifat patogen. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait adanya bakteri selulolitik dan amilolitik pada rumen sapi yang dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik pada ikan guna membantu proses pencernaan makanan pada ikan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret-Juni 2019 di Laboratorim Bioteknologi dan Laboratorium Perikanan Universitas Muhammadiyah Malang. Bahan-bahan yang digunakan adalah rumen sapi, *trypticase soy broth* (TSB), *carboxy methyl cellulose* (CMC), amilum, natrium agar (NA), *congo red*, iodin, NaCl, bakteri *Aeromonas hydrophila*, dan ikan nila. Alat-alat yang digunakan meliputi cawan petri, tabung reaksi, mikropipet (100-1.000 mikroliter), *laminar air flow* (LAF), spektrofotometer, autoklaf, hotplate, vortex, timbangan analitik, erlenmeyer, jarum ose, dan L-rod. Alat untuk uji patogenesis antara lain akuarium lima buah ukuran 60 cm x 30 cm x 30 cm, selang aerasi, batu aerasi, *blower*, selang, seser.

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Data ditampilkan dalam bentuk tabel, grafik, ringkasan, dan numerik data.

Isolasi Bakteri dari Rumen Sapi

Sumber inokulan berasal dari rumen sapi di rumah potong hewan (RPH), Batu. Rumen sapi diinokulasikan dengan metode sebaran (*spread plate*) pada media padat selektif *carboxy methyl cellulose* (CMC) 1% dan amilum 2% sebanyak 0,1 mL. Proses inokulasi isolat dilakukan pada *laminar air flow*, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

Pengamatan Morfologi Koloni dan Pemurnian Bakteri

Pengamatan morfologi dilakukan dengan cara mengamati secara langsung morfologi koloni bakteri yang terbentuk, pengamatan meliputi warna, bentuk, elevasi, tepian, dan karakteristik optik. Pemurnian

bakteri dilakukan dengan mengambil koloni yang tumbuh terpisah yang menunjukkan karakteristik morfologi yang berbeda dengan menginokulasikan isolat pada media agar CMC 1% dan amilum 2% baru dengan metode *streak* kuadran untuk mendapatkan koloni tunggal. Proses inokulasi isolat dilakukan pada *laminar air flow*. Diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Koloni tunggal yang terbentuk pada cawan petri kemudian diinokulasikan pada media agar CMC dan amilum sebagai stok bakteri.

Uji Aktivitas Selulolitik dan Amilolitik

Isolat bakteri berasal dari stok agar miring CMC dan amilum yang ditotolkan pada media agar CMC dan amilum dalam cawan petri yang telah dibagi menjadi empat kuadran. Pada media agar CMC dan amilum dalam cawan petri yang telah dibagi menjadi empat kuadran ditumbuhkan isolat bakteri yang berasal dari stok agar miring CMC dan amilum. Proses inokulasi isolat dilakukan pada *laminar air flow*. Inkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Pengujian aktivitas selulolitik dilakukan dengan metode *congo red* 0,1%; sedangkan pengujian aktivitas amilolitik dilakukan dengan penyiraman iodine 0,1% pada media agar amilum, yang kemudian dituang pada media yang telah ditumbuhi bakteri dan diinkubasi selama 15 menit dan dibilas dengan NaCl 0,1%. Pencucian ini bertujuan untuk membuang *congo red* dan iodine yang tidak berikatan dengan polisakarida. Isolat bakteri yang mampu menguraikan CMC dan amilum ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Indeks aktivitas selulase dan amilase dapat ditentukan dengan cara mengukur rasio diameter zona bening dan diameter koloni. Indeks aktivitas selulolitik dan amilolitik dapat diukur dengan menggunakan persamaan sebagai berikut (Kasana *et al.*, 2008):

$$I = \frac{D_{\text{zona bening}} - D_{\text{koloni}}}{D_{\text{koloni}}}$$

di mana: D = diameter

Uji Ketahanan Terhadap Kondisi Asam

Isolat bakteri dari stok agar miring CMC dan amilum diinokulasikan pada media TSB 10 mL dengan pH 3 dalam tabung reaksi. Proses inokulasi isolat dilakukan pada *laminar air flow* dan dilakukan pengukuran nilai OD (*optical density*) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm pada waktu inkubasi 2, 4, 6, dan 8 jam. Sebagai kontrol dan blanko digunakan larutan TSB tanpa inokulasi bakteri.

Uji Pertumbuhan Bakteri

Isolat bakteri dari stok agar miring CMC dan amilum diinokulasikan pada media TSB 25 mL

sebanyak 1 ose dan diinkubasi selama 24 pada suhu ruang. Dilakukan inokulasi hasil kultur cair pada media TSB ke media TSB baru dalam tabung reaksi sebanyak 1 mL isolat pada TSB cair 9 mL. Inkubasi pada suhu ruang dan dilakukan pengukuran nilai OD (*optical density*) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm setiap dua jam sekali selama 30 jam.

Uji Antagonistik Terhadap Bakteri Patogen

Kertas saring yang sudah dipotong bulat dengan diameter 0,5 cm direndam dalam isolat bakteri calon kandidat probiotik selama satu menit dengan kepadatan 10^6 cfu/mL. Bakteri *Aeromonas hydrophila* disebar pada media agar TSA dalam petri sebanyak 0,1 mL dengan kepadatan 10^6 cfu/mL. Kertas saring yang sudah terdapat masing-masing isolat bakteri diletakkan di atas media yang sudah ditumbuhi *Aeromonas hydrophila* pada cawan petri yang berbeda dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

Uji Penempelan Bakteri

Masing-masing isolat bakteri dari hasil kultur cair pada media TSB, diinokulasi pada media TSB baru pada tabung reaksi sebanyak 9 mL TSB dengan 1 mL isolat bakteri. Lempeng baja ukuran 4 cm x 0,5 cm dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi menggunakan *incubator shaker* selama 24 jam pada suhu ruang. Baja diambil dan diseka dengan kertas minyak guna mengambil isolat yang menempel pada baja dan diukur nilai OD (*optical density*) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm dengan pelarut NaCl 0,1%.

Uji Patogenesitas Bakteri

Masing-masing isolat dengan kepadatan 10^{10} cfu/mL sebanyak 10 mL dituangkan pada media budidaya ikan nila ukuran 10 cm dalam akuarium ukuran 60 cm x 30 cm x 30 cm yang berisi air setinggi 20 cm. Isolat diberikan pada hari pertama dan keenam. Disediakan satu akuarium kontrol tanpa pemberian isolat bakteri. Budidaya dilakukan selama 12 hari dan dilakukan pengamatan gejala klinis pada masing-masing akuarium.

HASIL DAN BAHASAN

Isolasi dan Pemurnian Bakteri

Isolat yang tumbuh menunjukkan bahwa bakteri tersebut termasuk jenis bakteri selulolitik dan amilolitik. Bakteri selulolitik merupakan bakteri heterotrof yang memiliki kemampuan menghidrolisis selulosa menjadi glukosa sedangkan bakteri amilolitik merupakan bakteri yang memiliki kemampuan menghidrolisis amilum menjadi glukosa. Bakteri yang mampu hidup dalam media yang mengandung CMC

dan amilum menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu mengasikkan enzim selulase dan amilase. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan enam isolat bakteri selulolitik dan amilolitik dengan dua kali pemurnian. Isolasi bakteri menggunakan media padat CMC 1%, dan amilum 2% sehingga bakteri yang dapat hidup pada media tersebut merupakan bakteri selulolitik dan amilolitik. Isolat yang tumbuh diamati morfologinya, mulai dari bentuk koloni, warna, tepian, dan elevasi. Hasil pengamatan gambaran morfologi enam isolat bakteri tersebut dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil ini menunjukkan bahwa pada rumen sapi terdapat bakteri selulolitik.

Menurut Yogyaswari *et al.* (2016), karakteristik isolat morfologi bakteri pada cairan rumen sapi *fries holland* dan *limousin* peranakan *ongle* yang memiliki aktivitas selulolitik yang tinggi di antaranya memiliki bentuk rata-rata bulat, tepi koloni rata dan tidak rata, warna koloni putih kekuningan dan putih susu, sedangkan ketinggian (elevasi) *raised* dan *convex*.

Uji Aktivitas Selulolitik

Hasil uji aktivitas selulolitik secara kualitatif menunjukkan bahwa masing-masing isolat yang telah dimurnikan mampu menghasilkan enzim selulase yang ditandai dengan terbentuknya zona bening pada media CMC *plates* setelah diuji menggunakan metode *congo red* (Gambar 1). Menurut Anand *et al.* (2009), *congo red* akan berikatan secara spesifik dengan polisakarida yang memiliki ikatan β-1,4 glikosida pada media tumbuh bakteri.

Zona bening menunjukkan adanya aktivitas hidrolisis oleh enzim ekstraseluler selulase yang diekskresikan oleh masing-masing isolat bakteri

sehingga membentuk zona bening. Besar kecilnya zona bening tergantung dari kemampuan masing-masing isolat dalam menghidrolisis selulosa. Menurut Afrilasari *et al.* (2016), enzim ekstraseluler yang diproduksi oleh kandidat bakteri probiotik akan membantu enzim yang terdapat dalam saluran pencernaan inang dalam menghidrolisis nutrisi pada pakan dan sebagai akibatnya proses pencernaan dan penyerapan dalam saluran pencernaan ikan akan berlangsung lebih mudah. Masing-masing isolat memiliki kemampuan berbeda-beda untuk menghasilkan enzim selulase. Hasil nilai indeks selulolitik masing-masing isolat dapat dilihat pada Gambar 2.

Berdasarkan Gambar 2. diketahui bahwa nilai indeks selulolitik terbesar ialah pada isolat AR sebesar 2,67 ± 0,35 cm. Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang mampu menghasilkan selulase yang berperan menghidrolisis selulosa menjadi produk yang lebih sederhana yaitu berupa glukosa (Baharuddin *et al.*, 2010).

Uji Aktivitas Amilolitik

Keenam isolat yang sudah diremajakan dilakukan uji aktivitas amilolitik untuk mengetahui aktivitas amilolitik masing-masing isolat. Pengujian dilakukan dengan cara menotolkan setitik bakteri (dapat menggunakan *cotton bud*) pada media agar selektif amilum dan diinkubasi selama 24 jam. Zona bening bisa diamati setelah dilakukan penyiraman dengan larutan iodine 1% dan dibiarkan selama 15 menit kemudian dicuci dengan larutan NaCl fisiologis.

Larutan iodine akan terserap oleh media selektif di sekitar zona bening sehingga akan menghasilkan

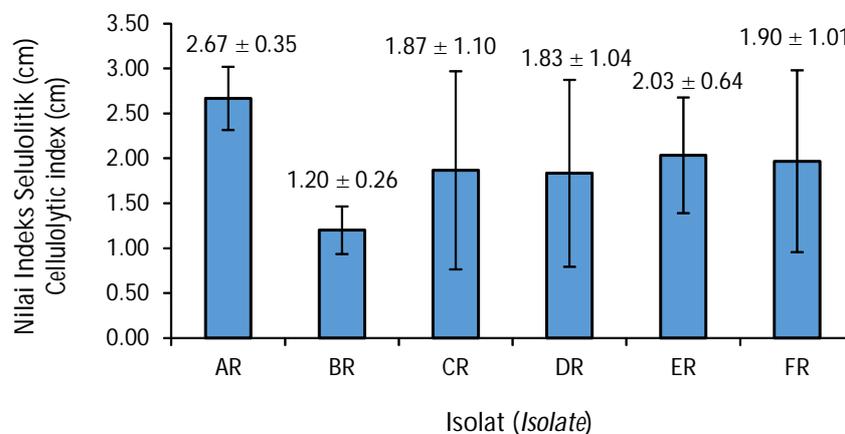
Tabel 1. Morfologi koloni bakteri hasil isolasi dari rumen sapi
Table 1. Morphology of bacterial colonies isolated from bovine rumen

Isolat <i>Isolate</i>	Warna <i>Color</i>	Bentuk <i>Form</i>	Elevasi <i>Elevation</i>	Tepian <i>Edge</i>	Karakteristik optik <i>Optical characteristics</i>
AR	Putih (<i>White</i>)	Bundar (<i>Circular</i>)	Kawah <i>Crateriform</i>	Bergelombang <i>Undulate</i>	Tidak tembus cahaya <i>Not translucent</i>
BR	Putih (<i>White</i>)	Tidak beraturan <i>Irregular</i>	Datar (<i>Flat</i>)	Rata (<i>Entire</i>)	Tembus cahaya <i>Transparent</i>
CR	Krem (<i>Cream</i>)	Filamen (<i>Filament</i>)	Datar (<i>Flat</i>)	Filamen (<i>Filament</i>)	Tembus cahaya <i>Transparent</i>
DR	Putih (<i>White</i>)	Bundar (<i>Circular</i>)	Menonjol <i>Raised</i>	Rata (<i>Entire</i>)	Tidak tembus cahaya <i>Not translucent</i>
ER	Putih (<i>White</i>)	Tidak beraturan <i>Irregular</i>	Kawah <i>Crateriform</i>	Bergelombang <i>Undulate</i>	Tidak tembus cahaya <i>Not translucent</i>
FR	Krem (<i>Cream</i>)	Filamen (<i>Filament</i>)	Datar (<i>Flat</i>)	Filamen (<i>Filament</i>)	Tembus cahaya <i>Transparent</i>



Gambar 1. Aktivitas selulolitik pada isolat ER (tanda panah menunjukkan zona bening).

Figure 1. Cellulolytic activity on ER isolate (the arrow showed inhibition zone).



Gambar 2. Nilai indeks selulolitik pada isolat bakteri.

Figure 2. Value of cellulolytic index in bacterial isolates.



Gambar 3. Aktivitas amilolitik pada isolat ER (tanda panah menunjukkan zona bening).

Figure 3. Amylolytic activity on ER isolate (the arrow showed inhibition zone).

warna biru tua. Aktivitas amilolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening pada media agar. Zona bening dapat terlihat jelas dengan menambahkan larutan iodine di sekitar koloni bakteri. Larutan iodine akan mewarnai pati yang terkandung di dalam media menjadi biru pekat, sedangkan bagian zona bening

yaitu bagian yang telah terjadi penguraian pati oleh enzim amilase akan terlihat bening atau tidak terwarnai. Zona bening yang terbentuk terkait dengan kelarutan dari enzim amilase. Semakin tinggi tingkat kelarutan suatu enzim maka akan semakin besar zona bening yang terbentuk.

Diameter zona bening umumnya berukuran lebih besar dibandingkan dengan diameter koloni, karena enzim amilase disekresikan ke lingkungan sekitarnya oleh bakteri pendegradasi amilum (Zverlova *et al.*, 2003).

Uji Ketahanan Terhadap Kondisi Asam

Pengujian ketahanan bakteri kandidat probiotik dalam kondisi asam sangat penting dilakukan untuk mengetahui kemampuan kandidat probiotik untuk bertahan atau tumbuh dalam kondisi asam pada saluran pencernaan ikan. Berikut hasil pengukuran nilai OD bakteri pada pH 3 dan pH 7 dengan panjang gelombang 620 nm (Tabel 2).

Dari keenam isolat yang diperoleh selanjutnya dipilih empat isolat yang akan diuji selanjutnya. Isolat yang dipilih adalah isolat AR, BR, ER, dan FR. Pemilihan kandidat probiotik didasarkan karakteristik morfologinya (Tabel 1.). Pada pengujian ini bakteri kandidat probiotik yang diperoleh mampu bertahan dalam suasana asam, hal ini dimungkinkan karena isolat diisolasi dari saluran pencernaan sapi sehingga sudah beradaptasi dengan kondisi pH rendah. Berdasarkan Tabel 4 menunjukkan bahwa keempat isolat (AR, BR, ER, dan FR) memiliki kemampuan yang baik untuk bertahan dalam kondisi asam jika dilihat dari masing-masing nilai OD yang didapatkan. Berrada *et al.* (1991) menyatakan bahwa waktu yang diperlukan mulai saat bakteri masuk sampai keluar dari lambung sekitar 90 menit. Isolat yang diseleksi untuk digunakan sebagai probiotik harus mampu bertahan dalam keadaan asam lambung selama sedikitnya 90 menit. Harjuni (2016) juga menguji toleransi isolat bakteri dari kakap putih terhadap pH 3 selama 48 jam.

Uji Pertumbuhan Bakteri

Tahap selanjutnya dilakukan pengamatan pertumbuhan bakteri pada keempat isolat. Pengamatan dilakukan selama dua jam sekali selama

30 jam dengan melakukan pengukuran OD untuk mengetahui fase pertumbuhan masing-masing isolat yang didapatkan. Berikut hasil pengukuran nilai OD selama 30 jam dapat dilihat pada Gambar 4.

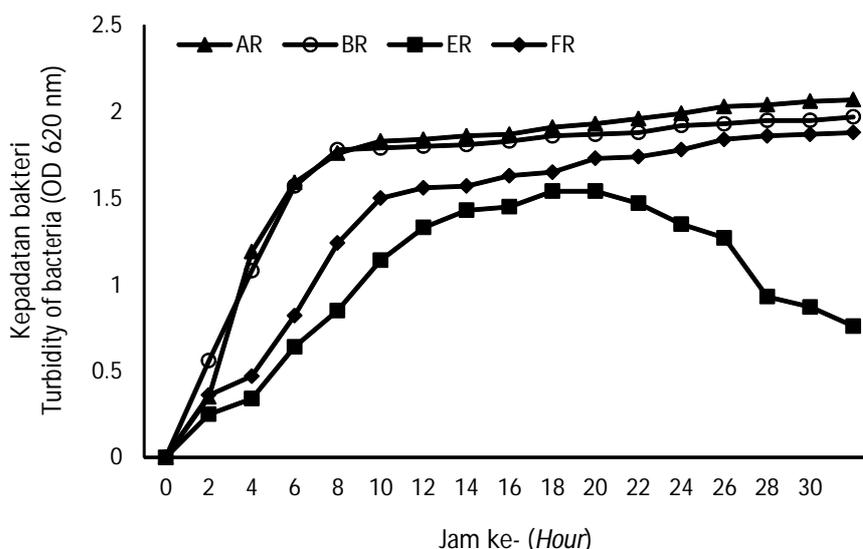
Untuk mengetahui jumlah bakteri yang tumbuh pada masing-masing isolat, data hasil nilai OD pada masing-masing isolat dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar. Kurva standar merupakan suatu kurva untuk menghitung jumlah sel bakteri secara tidak langsung, yakni dengan meregresikan nilai absorbansi dan jumlah koloni (TPC) ke dalam persamaan garis kurva standar. Hasil analisis regresi menunjukkan bahwa, hubungan antara nilai OD dan jumlah koloni mempunyai pola linier. Hubungan kedua parameter tersebut mempunyai persamaan sebagai berikut: isolat AR: $y = 8.809,2x - 4.875,8$; isolat BR: $y = 1.047,5x - 724,38$; isolat ER: $y = 1.082,8x - 310,34$; dan isolat FR: $y = 1.349,7x - 5.677,5$. Berdasarkan persamaan tersebut dapat digunakan untuk mengetahui banyaknya jumlah bakteri pada isolat secara lebih cepat setelah diketahui nilai OD-nya.

Berdasarkan kurva pertumbuhan pada Gambar 3, terlihat bahwa pada isolat AR dan BR fase lag atau fase penyesuaian aktivitas mikroba dalam lingkungan barunya yang terjadi sangat singkat, pada isolat AR fase stasioner terjadi pada jam ke-20 sampai 24. Pada isolat BR fase stasioner terjadi pada jam ke-24 sampai 30. Sedangkan pada isolat ER dan FR fase lag terjadi pada satu jam pertama, isolat ER mengalami fase eksponensial pada jam ke-2 sampai jam ke-10 dan selanjutnya mengalami fase stasioner yang dapat dilihat pada kurva di atas. Sedangkan pada jam ke-26—34 nilai OD terus mengalami penurunan, hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri mulai mengalami fase kematian. Menurut Rolf *et al.* (2012) fase eksponensial merupakan fase peningkatan aktivitas pertumbuhan bentuk maupun jumlah dengan kecepatan maksimum yang harus diimbangi oleh faktor biologi dan nonbiologi. Faktor biologi meliputi bentuk

Tabel 2. Hasil pengukuran kepadatan bakteri berdasarkan nilai *optical density* (OD) pada pH 3 dan pH 7

Table 2. The result of bacteria turbidity using optical density value on pH 3 and pH 7

Isolat Isolate	pH							
	3				7			
	2 jam 2 nd hours	4 jam 4 th hours	6 jam 6 th hours	8 jam 8 th hours	2 jam 2 nd hours	4 jam 4 th hours	6 jam 6 th hours	8 jam 8 th hours
AR	0.4	0.49	0.59	0.61	1.19	1.6	1.77	1.8
BR	0.42	0.5	0.6	0.63	1.08	1.57	1.78	1.79
ER	0.19	0.22	0.26	0.3	0.34	0.64	0.85	1.137
FR	0.32	0.36	0.4	0.44	0.47	0.82	1.24	1.5



Gambar 4. Grafik pertumbuhan isolat bakteri kandidat probiotik yang diisolasi dari rumen sapi.

Figure 4. Growth chart of bacterial isolates from cow rumen.

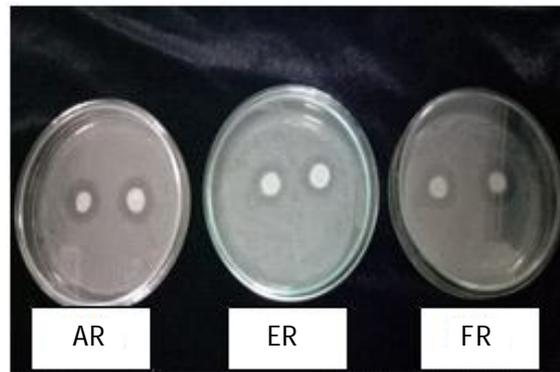
dan sifat mikroorganisme terhadap lingkungannya. Sedangkan faktor nonbiologi meliputi kandungan nutrisi pada media pertumbuhannya, pH, dan suhu. Isolat FR mengalami fase eksponensial mulai pada jam ke-2 terus meningkat sampai pada jam ke-24, selanjutnya isolat FR mengalami fase stasioner. Semua isolat mengalami fase lag yang relatif singkat dikarenakan dari awal isolat dikultur di media yang sama sehingga tidak butuh waktu lama dalam proses penyesuaian. Masing-masing isolat mengalami fase stasioner pada kurun waktu yang berbeda-beda tergantung dari pertumbuhan bakterinya. Dari keempat isolat, ER memiliki fase hidup yang paling singkat. Sedangkan fase eksponensial dari empat isolat terjadi sangat cepat dan sangat signifikan. Menurut Rolf *et al.* (2012), kurva pertumbuhan menggambarkan adanya proses pembelahan sel maupun pertumbuhan bertahap suatu mikroorganisme yang dimulai dari awal pertumbuhan sampai dengan berakhirnya aktivitas, terdiri atas empat fase utama yaitu: lag, eksponensial, stasioner, dan kematian. Fase lag merupakan fase penyesuaian atau pengaturan suatu aktivitas mikroba dalam lingkungan barunya.

Uji Antagonistik Terhadap Bakteri Patogen

Bakteri patogen yang digunakan untuk uji ini ialah bakteri *Aeromonas hydrophila*. Bakteri ini dipilih karena sering menyerang pada ikan budidaya dan dapat menyebabkan kematian massal. Bakteri ini akan menyerang ikan yang luka dan stres akibat adanya perubahan pada kondisi lingkungan budidaya. Uji aktivitas antagonistik terhadap bakteri patogen ini

bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Kemampuan isolat bakteri kandidat probiotik dalam melawan bakteri patogen ditunjukkan dengan adanya zona bening. Zona bening yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 4, sedangkan diameter zona bening masing-masing isolat disajikan pada Tabel 6.

Berdasarkan Tabel 6, diketahui bahwa ketiga isolat tersebut (AR, ER, dan FR) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* sebagai bakteri patogen pada ikan, hal ini ditunjukkan dengan adanya zona bening. Isolat BR tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* yang ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Aktivitas penghambatan tersebut dapat terjadi karena isolat bakteri memproduksi senyawa tertentu yang mampu menghambat pertumbuhan *Aeromonas hydrophila*. Menurut Mulyasari *et al.* (2016); Zhou *et al.* (2018), aktivitas antagonistik yang dilakukan oleh bakteri selulolitik terhadap bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*, disebabkan bakteri tersebut mampu memproduksi senyawa-senyawa anti bakteri. Senyawa tersebut seperti bakteriosin (contohnya subtilin dan koagulin), antibiotik (contohnya surfactin dan bayclin) dan asam-asam organik. Mekanisme kerja dari bakteriosin dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen yakni dengan memblokir formasi pori-pori pada dinding sel dan membran sel bakteri target sehingga dapat menyebabkan ketidak seimbangan permeabilitas sel, serta menghambat aktivitas substansi genetik (DNA dan RNA).



Gambar 5. Zona bening uji daya hambat isolat AR, ER, dan FR.
 Figure 5. Clear zone inhibition resistance test of bacterial isolate AR, ER, and FR.

Tabel 3. Nilai diameter zona hambat uji antagonistic
 Table 3. Antagonistic test inhibition zone diameter value

Kode isolat <i>Isolate code</i>	Diameter zona hambat <i>Diameter of inhibitory zone (mm)</i>
AR	11
BR	-
ER	15
FR	17

Ketiga isolat memiliki kemampuan antibakteri yang berbeda-beda yang ditunjukkan dengan besarnya zona hambat yang dihasilkan masing-masing isolat bakteri. Zona hambat tertinggi dihasilkan oleh isolat FR dengan nilai zona bening sebesar 17 mm. Davis & Stout (1971) menyatakan bahwa apabila zona hambat yang dihasilkan memiliki daerah hambatan ³ 20 mm berarti memiliki kekuatan antibakteri sangat kuat, bila daerah hambatan berkisar 10-20 mm berarti kuat, bila daerah hambatannya 5-10 mm berarti sedang, dan bila daerah hambatannya 5 mm atau kurang dari 5 mm maka aktivitas antibakteri tergolong lemah. Agen antibakteri seperti asam laktat dan bakteriosin yang memiliki bakteri probiotik dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Hal tersebut disebabkan karena agen antibakteri mampu menurunkan pH menjadi rendah sehingga bakteri patogen sulit bertahan hidup (Tambekar & Bhutada, 2010).

Uji Penempelan Bakteri

Uji penempelan bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri dapat menempel pada usus ikan atau malah terbuang dengan sisa-sisa makanannya. Uji penempelan menggunakan lempeng baja sebagai penempelan bakterinya Dewanti & Wong (1995). Lempeng baja yang akan digunakan disterilkan

terlebih dahulu dengan cara direndam dalam larutan desinfektan selama 24 jam dan kemudian disterilkan kembali pada suhu 121°C selama dua jam. Hal ini dilakukan bertujuan untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada baja yang akan digunakan saat pengujian. Lempeng baja yang sudah steril kemudian dimasukkan dalam TSB cair steril sebanyak 10 mL yang telah berisi masing-masing isolat dengan kepadatan 10⁶ cfu/mL pada tabung reaksi. Lama waktu inkubasi selama 24 jam pada suhu ruang, serta dikocok. Kemudian diseka dengan kertas minyak lalu dilakukan uji spektrofotometer untuk mengetahui nilai OD. Besar kecilnya nilai OD menunjukkan banyak sedikitnya bakteri yang mampu menempel pada tembaga yang diibaratkan sebagai usus dalam ikan. Hasil pengukuran nilai OD 620 nm disajikan pada Tabel 4.

Salah satu syarat untuk menjadi bakteri kandidat probiotik ialah memiliki kemampuan menempel pada substrat. Berdasarkan hasil uji, semua isolat memiliki kemampuan untuk menempel pada substrat, meskipun kemampuan penempelannya berbeda-beda. Kemampuan bakteri untuk menempel pada substrat dapat diketahui setelah lempeng baja yang berperan sebagai substrat dibersihkan dengan NaCl 0,1% untuk mengetahui banyaknya bakteri yang menempel dengan dilakukan pengukuran nilai OD. Berdasarkan Tabel 4, diketahui bahwa isolat ER memiliki kemampuan

Tabel 4. Uji penempelan dari isolat bakteri rumen sapi
 Table 4. Attachment test OD bacterial isolate of bovine rumen

Kode isolat <i>Isolate code</i>	Nilai OD 620 nm <i>Value of OD 620 nm</i>	Kemampuan penempelan <i>Attachment ability (cfu/mL)</i>
AR	0.02	4.8 x 10 ²
BR	0.01	9.6 x 10 ²
ER	0.05	24 x 10 ²
FR	0.01	7.8 x 10 ²

menempel pada substrat lebih baik dari yang lainnya yakni nilai OD sebesar 0,05 dengan kepadatan bakteri 24 x 10² cfu/mL. Menurut Verschuere *et al.* (2000), penempelan bakteri pada permukaan inang atau lapisan mukosa dan kemampuannya untuk membentuk koloni dalam saluran pencernaan inang merupakan kriteria penting untuk seleksi awal kandidat probiotik. Kemampuan masing-masing bakteri untuk menempel dan berkembang pada lapisan mukosa usus berfungsi untuk memastikan keberadaan bakteri dalam saluran pencernaan sehingga mampu memberikan efek positif pada inang (Luis-Villaseñor *et al.*, 2011). Rohy *et al.* (2014) mendapatkan hasil jumlah total bakteri tertinggi pada usus halus ikan gurami dengan pemberian beberapa pakan komersil sebesar 95 x 10⁸ cfu/mL sedangkan pada usus besar 116 x 10⁷ cfu/mL.

Uji Patogenesitas Bakteri

Uji ini bertujuan untuk mengetahui isolat bakteri calon kandidat probiotik yang diberikan ke inang bersifat patogen atau tidak. Berikut hasil uji patogenesitas calon kandidat probiotik dapat dilihat pada Tabel 5.

Ikan di budidaya selama 12 hari dengan pemberian makan setiap pagi dan sore hari sekenyang-kenyangnya. Saat pemberian pakan juga dilakukan pengamatan gejala klinis pada masing-masing akuarium. Hari ke-1 sampai dengan hari ke-9 semua ikan dengan pemberian isolat masing-masing dalam kondisi sehat. Pergerakan lincah, serta nafsu makannya lahap. Tidak ada luka pada tubuhnya ataupun ikan yang menggosok-gosokkan badannya pada dinding akuarium. Akan tetapi pada hari ke-5 ikan yang sebagai kontrol mengalami kematian sebanyak dua ekor dengan ciri-ciri ikan terserang jamur. Hari ke-7 semua ikan yang terdapat dikontrol mengalami kematian, dengan gejala klinis tubuh berjamur serta selama dua hari terakhir ikan tidak nafsu makan. Sedangkan pada hari ke-10, dua ikan pada akuarium yang diberikan bakteri isolat AR menunjukkan aktivitas yang berbeda, cenderung berdiam di dasar, pada punggungnya terdapat sedikit jamur, serta nafsu makannya menurun. Hari ke-11 pada akuarium yang telah diberikan isolat AR terdapat bintik putih pada mata ikan, cenderung menyendiri dan nafsu makan turun. Hari terakhir pengamatan terjadinya kematian pada akuarium kode

Tabel 5. Uji patogenesitas bakteri calon kandidat probiotik
 Table 5. Bacterial pathogenicity test of the prospective probiotic candidates

Isolat <i>Isolate</i>	Parameter <i>Parameters</i>	AR	BR	ER	FR
Pergerakan (<i>Movement</i>)		++	+++	+++	+++
Nafsu makan (<i>Apetite</i>)		++	+++	+++	+++
Luka di badan (<i>Body wounds</i>)		-	-	-	-
Serangan penyakit (<i>Disease attack</i>)		+	-	-	-

Keterangan (*Note*):
 - tidak ada (*none*)
 + sedikit/cukup (*fairly*)
 ++ baik (*good*)
 +++ sangat baik (*very good*)

AR sebanyak dua ekor. Punggung ikan ditumbuhi jamur dan terdapat bintik putih pada matanya. Pada uji antagonistik isolat AR menunjukkan kemampuan dapat melawan bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* yang ditunjukkan dengan mengeluarkan zona bening yang dapat dilihat pada Tabel 3. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat AR hanya mampu melawan bakteri patogen tetapi tidak mampu melawan jamur yang terpapar dari lingkungan. Sedangkan akuarium dengan pemberian isolat BR, ER, dan FR ikannya dalam kondisi sehat seperti pada saat awal budidaya. Menurut Verschuere *et al.* (2000), bahwa sangat penting untuk mengetahui bahwa bakteri kandidat probiotik tidak bersifat patogen ketika dipaparkan ke inang. Hasil uji patogenesitas menunjukkan bahwa bakteri kandidat probiotik yang diperoleh tidak bersifat patogen dan aman diberikan ke ikan.

KESIMPULAN

Isolasi bakteri dari rumen sapi yang dapat menghasilkan enzim selulase dan amilase diperoleh enam isolat yakni isolat AR, BR, CR, DR, ER, dan FR. Berdasarkan hasil dari berbagai uji yang telah dilakukan, diperoleh empat isolat (AR, BR, CR, dan DR) yang memenuhi syarat untuk sebagai kandidat probiotik pada ikan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Muhammadiyah Malang yang telah mendanai penelitian ini melalui skim Penelitian Pengembangan IPTEKS (P2I).

DAFTAR ACUAN

Afrilasari, W., Widanarni, & Meryandini A. (2016). Effect of probiotic *Bacillus megaterium* PTB 1.4 on the population of intestinal microflora, digestive enzyme activity and the growth of catfish (*Clarias* sp.). *Hayati Journal of Biosciences*, 23, 168-172.

Anand, Vennison, Sankar, Prabhu, Vasan, Raghuraman, Geoffrey, & Vendan. (2009). Isolation and characterization of bacteria from the gut of bombyx mori that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of Insect Science*, 10(107), 1-20.

Baharuddin, A.S., Razak, M.N.A., Hock, L.S., Ahmad, M.N., Aziz, S.A., Rahman, N.A.A., & Shah, U.K.M. (2010). Isolation and characterization of thermophilic cellulase producing bacteria from empty fruit bunches-palm oil mill effluent compost. *American Journal of Applied Sciences*, 7(1), 56-62.

Berrada, N., Lemeland, J.F., Laroche, G., Thouvenot, P., & Piala, M. (1991). Bifidobacterium from fermented milks: Survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.*, 74, 409-413.

Davis, W.W., & Stout, T.R. (1971). Disc plate method of microbiological antibiotic assay. I. Factors influencing variability and error. *Appl Microbiol.*, 22, 659-665.

Dewanti, R. & Wong, A.C.L. (1995). Influence of culture condition on biofilm formation by *Escherichia coli*. *Journal Food Microbial.*, 26, 147.

Harjuni, F. & Mulyadi, A.B. (2016). Tolerance of probiotic bacterial candidate from kakap putih on pH and bile salt. *Jurnal Online Mahasiswa Bidang Perikanan dan Ilmu Kelautan*, 3(2), 1-10.

Kasana, R.C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Curr. Microbiol.*, 57(5), 503-7.

Lamid, M., Chuzaemi, S., Puspaningsih, N., & Kusmantono. (2006). Inokulasi bakteri xilanolitik asal rumen sebagai upaya peningkatan nilai nutrisi jerami padi. *Jurnal Protein*, 14(2), 122-128.

Luis-Villaseñor, I.E., Macías-Rodríguez, M.E., Gómez-Gil, B., Ascencio-Valle, F., Campa-Córdova, A.I. (2011). Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larva cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 321(1-2), 136-144.

Mudasir, A.D., 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 & Biodegradation*, 98, 73-80.

Mulyasari, Widanarni, Suprayudi, M.A., Zairin, M.Jr., & Sunarno, M.T.D. (2016). Screening of probiotics from the digestive tract of gourami (*Osphronemus goramy*) and their potency to enhance the growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *AAFL Bioflux*, 9(5), 1121-1132.

Murtius, W.S. (2016). Aktivitas amilolitik pada parutan ubi kayu (*Manihot utilissima*) yang diperam dengan waktu yang berbeda. *Jurusan Teknologi Pertanian Andalas*, 20(1), 1410-1920.

Rohy, G.S., Rahardja, B.S., & Agustono. (2014). Jumlah total bakteri dalam saluran pencernaan ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) dengan pemberian beberapa pakan komersil yang berbeda. *Jurnal ilmiah perikanan dan kelautan*, 6(1), 23.

Rolf, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A.D., Alston, M., Stringer, M.F.,

- Betts, R.P., Baranyi, J., & Peck, M.W. (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.
- Saratale, G.D., Saratale, R.G., & Oh, S.E. (2012). Production and characterization of multiple cellulolytic enzymes by isolatd *Streptomyces* sp. MDS. *Biomass and Bioenergy*, 47, 302 -315.
- Tambekar, D.H. & Bhutada S.A. (2010). An evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. from milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. *Recent Research Science and Technology*, 2(10), 82-88.
- 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.
- Yogyaswari, A.S., Rukmi, I., & Raharjo, B. (2016). Eksplorasi bakteri selulolitik dari cairan rumen sapi peranakan *fries holland* (PFH) dan *limousine* peranakan *ongle* (LIMPO). *Jurnal Biologi*, 5(4), 88.
- Zhou, S., Xia, Y., Zhu, C., & Chu, W. (2018). Isolation of marine *Bacillus* sp. with antagonistic and organic-substances-degrading activities and its potential application as a fish probiotic. *Marine Drugs*, 16(196), 7.
- Zverlova, V.V., Holl, W., & Schwarz, H. (2003). Enzymes for digestion of cellulose and other polysaccharides in the gut of longhorn beetle larvae, *Rhagium inquisitor* L. (Col., Cerambycidae). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51(2), 175-179.