

## STUDI *BACILLUS FIRMUS* SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK DALAM MENGHADAPI *Aeromonas hydrophila* PADA MEDIA BUDIDAYA

*The Study of Bacillus firmus as Probiotic Candidate in Suppressing Aeromonas hydrophila in Culture Media*

Alfabetian Harjuno Condro Haditomo<sup>1</sup>, Angela Mariana Lusiastuti<sup>2</sup> dan Widanarni<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program studi Budidaya Perairan FPIK UNDIP

<sup>2</sup>Balai Riset Penelitian Budidaya Air Tawar Sempur Bogor

<sup>3</sup>Program studi Budidaya Perairan FPIK IPB

Email : [condrohaditomo@gmail.com](mailto:condrohaditomo@gmail.com)

Diserahkan tanggal 28 November 2015, Diterima tanggal 8 Januari 2016

### ABSTRAK

Pengendalian penyakit bakterial yang umum dilakukan dengan pemakaian antibiotik atau bahan kimia sudah tidak diperbolehkan lagi karena menimbulkan patogen yang resisten terhadap bahan kimia tersebut, terlebih jika penggunaan tidak sesuai dengan anjuran yang diberikan. Dampak negatif terhadap kesehatan konsumen berupa residu antibiotik juga menjadi pertimbangan yang harus diperhatikan. Manipulasi terhadap populasi mikroba yang berada di perairan guna pencegahan sebelum terjadinya serangan bakteri yang bersifat mematikan perlu dilakukan sebagaimana konsep probiotik sebagai biokontrol. Tujuan penelitian ini adalah menguji kandidat probiotik dalam menekan atau menghambat bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*. Penelitian ini dilaksanakan dalam dua tahap. Tahap pertama adalah tahap pengujian bakteri kandidat probiotik secara *in vitro* menggunakan metode zona hambat dan kultur bersama pada media agar. Tahap kedua adalah uji tentang bakteri kandidat probiotik dengan patogen pada media budidaya. Hasil terbaik penelitian tahap pertama pada uji kultur bersama antara kandidat probiotik *B. firmus* dengan *A. hydrophila* pada skala *in vitro* adalah dengan penambahan probiotik *B. firmus* sebanyak  $10^8$  cfu/ml. Sedangkan pada penelitian tahap kedua didapatkan hasil berturut-turut perlakuan D dengan tingkat kelangsungan hidup (SR) mencapai 90%, perlakuan C dengan SR 75%, perlakuan A dengan SR 50% dan perlakuan K dengan SR 50%.

**Kata kunci:** *Bacillus firmus*, probiotik, *Aeromonas hydrophila*, media budidaya

### ABSTRACT

Controlling bacterial disease with the use of antibiotics or chemicals is no longer allowed as it results in pathogens that are resistant to the chemicals, especially when not in accordance with the recommendations provided. The negative impacts of the antibiotics residues on the consumers' health also need to be considered. Manipulation of microbial populations present in the waters as prevention before the lethal attack of bacteria needs to be done which is in accordance with the concept of probiotics as biocontrol. The purpose of this study was to test the probiotic candidates in suppressing or inhibiting pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*. This study was conducted in two stages. The first stage was to test a candidate probiotic bacteria *in vitro* using culture methods and inhibition zone on the media together. The second stage was to test candidate probiotic bacteria to pathogens on the cultivation media. The best results in the first phase of the research is shared culture test between probiotic candidate *B. FIRMUS* with *A. hydrophila* on *in vitro* scale is the addition of the probiotic *B. FIRMUS*  $10^8$  cfu / ml. While in the second phase of the research results obtained successively: treatment D with a survival rate (SR) reaches 90%, treatment C with SR 75%, treatment A with SR 50% and treatment K with SR 50%.

**Keywords:** *Bacillus FIRMUS*, probiotics, *Aeromonas hydrophila*, media cultivation

### PENDAHULUAN

Pengendalian penyakit bakterial yang umum dilakukan dengan pemakaian antibiotik atau bahan kimia sudah tidak diperbolehkan lagi. Hal ini dikarenakan antibiotik dapat menjadikan patogen-patogen menjadi resisten, berdampak negatif terhadap kesehatan konsumen berupa residu antibiotik dan menimbulkan kontaminasi terhadap lingkungan perairan. Sistem pengendalian penyakit yang ramah lingkungan haruslah dimunculkan, maka probiotik dipandang sebagai langkah

alternatif yang berperan sebagai kontrol biologis yang digunakan sebagai musuh alami bakteri patogen.

Manipulasi terhadap populasi mikroba yang berada di perairan guna pencegahan sebelum terjadinya serangan bakteri yang bersifat mematikan perlu dilakukan sebagaimana konsep probiotik sebagai biokontrol. Namun demikian penggunaan probiotik di dunia perikanan saat ini memakan biaya yang cukup tinggi karena harus digunakan secara rutin setiap hari atau beberapa hari sekali hingga waktu panen tiba. Sehingga diperlukan solusi yang lebih baik dan tepat di dalam pemakaian

probiotik untuk dapat menekan biaya produksi dan meningkatkan keuntungan usaha budidaya perikanan.

Pemberian bakteri probiotik ke dalam media pemeliharaan bertujuan untuk meningkatkan kesehatan ikan sebagai inang dengan cara menekan populasi bakteri patogen, meningkatkan kualitas perairan atau membantu mendegradasi limbah organik (Irianto, 2005). Bakteri probiotik dapat diperoleh dari lingkungan perairan yang memiliki persamaan habitat dengan bakteri patogen dan ikan. Menurut Moriarty (1999), kriteria probiotik yang paling cocok dalam budidaya ikan adalah bakteri yang dapat memberikan pengaruh positif terhadap ekosistem dan rantai makanan. Salah satu kandidat bakteri probiotik yang telah didapatkan adalah *B. firmus*.

Tujuan penelitian ini melihat kemampuan kandidat probiotik dalam menekan atau menghambat bakteri patogen *A. hydrophila* secara *in vitro* dan *in vivo*.

**METODE PENELITIAN**

Penelitian ini dilakukan pada skala laboratorium. Penelitian ini terdiri dari dua tahap. Tahap pertama adalah tahap pengujian bakteri kandidat probiotik secara *in vitro* menggunakan metode kultur bersama pada media agar. Tahap kedua adalah tahap uji tantang bakteri kandidat probiotik dengan bakteri patogen pada media budidaya. Prosedur pelaksanaan secara garis besar adalah sebagai berikut:

Tahap pertama adalah tahap pengujian bakteri kandidat probiotik secara *in vitro* menggunakan metode zona hambat dan kultur bersama pada media agar. Uji ini dapat dilakukan dengan cara mencampurkan atau mengkultur secara bersama pada media broth (TSB) sebagai media tumbuh antara bakteri probiotik dengan bakteri patogen. Setelah diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam. Hasil pencampuran antara bakteri probiotik dan bakteri patogen ditanam pada cawan petri yang berisi media RS yang merupakan media spesifik *A. hydrophila* dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Kultur bersama dilakukan pada saat bersamaan dengan tingkat kepadatan yang berbeda-beda antara bakteri probiotik dan bakteri patogen. Hal ini dilakukan guna mengetahui konsentrasi terbaik dari penghambatan *A. hydrophila* oleh bakteri probiotik *B. firmus* pada media agar. Hasil penanaman tersebut dibandingkan antara campuran bakteri probiotik dan bakteri patogen dengan kontrol yang hanya berisi bakteri patogen. Hasil terbaik adalah pada jumlah bakteri pada media campuran yang lebih sedikit dengan media kontrol.

Tahap kedua adalah tahap uji tantang bakteri kandidat probiotik dengan bakteri patogen pada media budidaya. Hasil yang diperoleh pada penelitian tahap pertama akan dijadikan dasar pertimbangan dalam penelitian tahap kedua ini. Pada tahap ini dilakukan perlakuan yaitu:

- Perlakuan A yaitu perlakuan dengan penambahan *A. hydrophila* 10<sup>2</sup> cfu/ml namun tanpa penambahan probiotik *B. firmus*.
- Perlakuan C yaitu perlakuan penambahan *A. hydrophila* 10<sup>2</sup> cfu/ml dengan penambahan probiotik *B. firmus* 10<sup>8</sup> cfu/ml setiap 2 hari sekali dan tanpa penyiponan.
- Perlakuan D yaitu perlakuan penambahan *A. hydrophila* 10<sup>2</sup> cfu/ml dengan penambahan probiotik *B. firmus* 10<sup>8</sup> cfu/ml dan disipon (dilakukan setiap dua hari).
- Perlakuan K yaitu perlakuan tanpa penambahan bakteri apapun.

Analisis data hasil pengamatan dari penelitian tahap pertama dan kedua dianalisis secara deskriptif.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Kandidat probiotik *B. firmus* yang digunakan merupakan salah satu hasil *screening* bakteri penelitian Lusiasuti (2010). Dalam uji zona hambat, bakteri ini terbukti mampu untuk menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* secara *in vitro* dengan metode zona hambat dengan kertas cakram. Hasil pengukuran kepadatan bakteri didapatkan *Aeromonas hydrophila* 1,77x10<sup>17</sup> cfu/ml dan *B. firmus* 0,55x10<sup>16</sup> cfu/ml.

**Identifikasi probiotik uji**

Probiotik *B. firmus* yang digunakan dalam penelitian ini mampu membentuk zona hambat terhadap *A. hydrophila* dengan jarak 3 mm. Dari hasil pengamatan diketahui bahwa kandidat probiotik *B. firmus* memiliki bentuk morfologi batang, elevasi koloni cembung dengan tepian halus. Karakteristik biokimia yang didapatkan bersifat motil, katalase positif, oksidasi negatif dan sifat Gram positif. Hal ini cukup sesuai dengan Feliatra *et al.* (2004), dimana *B. firmus* memiliki ciri morfologi diantaranya adalah memiliki motil oleh *flagel peritrichous*, endospora berbentuk oval, bundar atau silinder. Bakteri ini bersifat fakultatif aerob, tersebar luas pada bermacam-macam habitat, serta tidak bersifat patogen terhadap vertebrata ataupun invertebrata.

**Pertumbuhan *B. firmus* pada media agar**

Kepadatan *B. firmus* setelah 24 jam pada media broth (TSB) didapatkan hasil 0,55x10<sup>16</sup> cfu/ml. Diketahui bahwa fase eksponensial probiotik *B. firmus* terjadi pada jam ke-14 hingga jam ke-22 dengan peningkatan jumlah mencapai puncaknya pada jam ke-22 dengan kepadatan bakteri mencapai 1,20x10<sup>17</sup> cfu/ml dan mulai menurun setelahnya.

Tabel 1. Perbandingan kultur bersama probiotik *B. firmus* dengan *A. hydrophila*

<i>B. firmus</i> (cfu/ml)	<i>A. hydrophila</i> (cfu/ml)	Hasil
10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	++++
10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	+++
10 <sup>8</sup>	10 <sup>2</sup>	+
10 <sup>12</sup>	10 <sup>2</sup>	++
-	10 <sup>2</sup> (kontrol)	+++++

Keterangan: +++++ = *A. hydrophila* tumbuh memenuhi seluruh cawan  
 ++++ = *A. hydrophila* tumbuh sebagian besar cawan  
 +++ = *A. hydrophila* tumbuh setengah bagian cawan  
 ++ = *A. hydrophila* tumbuh seperempat bagian cawan  
 + = *A. hydrophila* tumbuh sedikit pada cawan

Pada tahap ini dilakukan pengujian kultur bersama (efikasi dosis probiotik *B. firmus* terhadap *A. hydrophila*) secara *in vitro* pada media TSB dan di plating pada media TSA dan RS agar. Pengujian kultur bersama dilakukan dengan membandingkan hasil kultur bersama (probiotik *B. firmus*: *A. hydrophila*= $10^2$  cfu/ml:  $10^2$  cfu/ml); (probiotik *B. firmus*: *A. hydrophila*= $10^4$  cfu/ml:  $10^2$  cfu/ml) (probiotik *B. firmus*: *A. hydrophila*= $10^8$  cfu/ml:  $10^2$  cfu/ml) dan (probiotik *B. firmus*: *A. hydrophila*= $10^{12}$  cfu/ml:  $10^2$  cfu/ml). Uji kultur bersama dilakukan dengan membandingkan hasil kultur bersama dengan kontrol yaitu media yang hanya ditanam *A. hydrophila*  $10^2$ cfu/ml saja (Tabel 1).

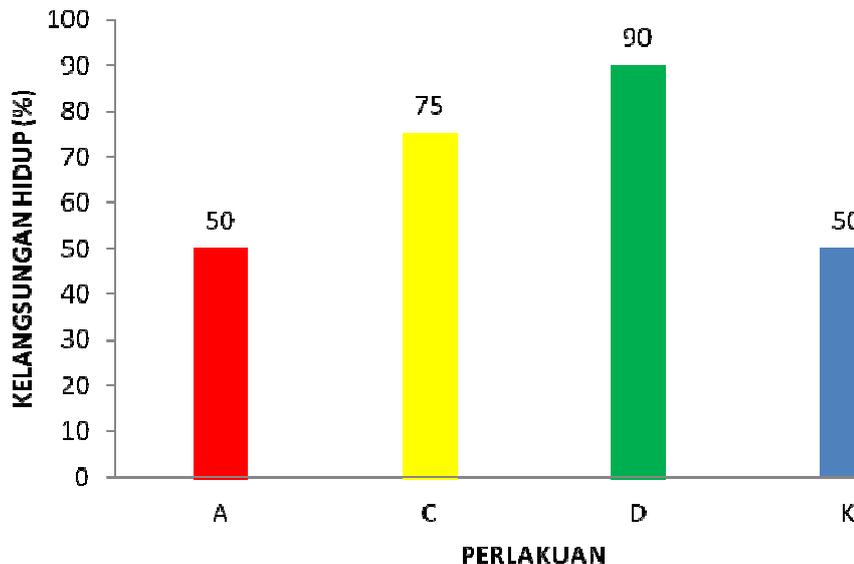
Dari Tabel 1 diketahui bahwa hasil terbaik dari probiotik *B. firmus* yang diuji tantang dengan *A. hydrophila*  $10^2$  cfu/ml secara *in vitro* adalah pada konsentrasi probiotik *B. firmus*  $10^8$  cfu/ml. Pada konsentrasi probiotik *B. firmus* yang lebih tinggi, namun hasilnya kurang optimal diduga karena adanya persaingan nutrisi dan oksigen yang tinggi diantara sesama probiotik *B. firmus* sehingga menyebabkan keseimbangan bakteri pada media terganggu. Dugaan ini didasarkan pada pernyataan Fuller (1992) bahwa efektivitas probiotik diantaranya dipengaruhi oleh komposisi bakteri, dosis/konsentrasi yang digunakan, umur dan kualitas probiotik. Nikoskelainen *et al.* (2001) juga menyatakan bahwa penggunaan probiotik dalam konsentrasi tinggi ternyata tidak

menjamin perlindungan yang lebih baik terhadap inang.

Hasil terbaik dari uji kultur bersama antara probiotik *B. firmus* dengan *A. hydrophila* pada skala *in vitro* adalah dengan penambahan probiotik *B. firmus* sebanyak  $10^8$  cfu/ml pada media broth. Berdasarkan hasil ini maka pada penelitian tahap kedua yaitu aplikasi probiotik *B. firmus* sebanyak  $10^8$  cfu/ml pada media budidaya dengan pemeliharaan ikan digunakan perlakuan aerasi dan pakan.

Keberadaan oksigen dan nutrisi (sisa pakan) yang ada di perairan mampu meningkatkan jumlah *B. firmus* di media budidaya. Probiotik *B. firmus* merupakan bakteri fakultatif aerob lebih menyukai kondisi lingkungan yang cukup oksigen sehingga pertumbuhannya menjadi lebih baik. Probiotik *B. firmus* merupakan bakteri pelarut fosfat dan dapat menghasilkan fitohormon sehingga bakteri ini mampu memanfaatkan pakan dan menguraikannya menjadi bentuk yang lebih sederhana. Dengan kemampuan inilah maka *Bacillus* sp seringkali dimanfaatkan untuk penguraian substrat polimer organik, memperbaiki kualitas air, mengurai jumlah bakteri patogen melalui penyeimbang populasi mikroba serta meningkatkan kesehatan dan pertumbuhan inang seperti ikan (Irianto, 2005).

Hasil yang diperoleh dari pengaplikasian probiotik pada pemeliharaan ikan uji yang diuji tantang dengan *A. hydrophila* disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Tingkat kelangsungan hidup ikan uji setelah pemberian probiotik.

Ket: Perlakuan penambahan *A. hydrophila*  $10^2$  cfu/ml dan tanpa pemberian probiotik (A); Perlakuan penambahan *A. hydrophila*  $10^2$  cfu/ml dan pemberian probiotik *B. firmus*  $10^8$  cfu/ml yang diberikan setiap 2 hari (C); Perlakuan penambahan *A. hydrophila*  $10^2$  cfu/ml dan pemberian probiotik *B. firmus*  $10^8$  cfu/ml dan penyiponan yang dilakukan setiap 2 hari (D); Perlakuan tanpa penambahan *A. hydrophila* dan tanpa penyiponan (PK).

Pengaplikasian probiotik *B. firmus* guna menangani dan mencegah serangan *A. hydrophila*. Dari penelitian ini diperoleh hasil terbaik setelah dilakukan pengamatan selama dua minggu, berturut-turut adalah pada perlakuan D yaitu dengan penambahan probiotik *B. firmus*  $10^8$  cfu/ml dan disipon (setiap dua hari) dengan tingkat kelangsungan hidup (SR) mencapai 90%. Selanjutnya perlakuan C dengan penambahan probiotik

*B. firmus*  $10^8$  cfu/ml setiap 2 hari sekali dan tanpa penyiponan dengan SR 75%. Lalu perlakuan A yaitu perlakuan dengan penambahan *A. hydrophila* namun tanpa penambahan probiotik *B. firmus* dengan SR 50%. Dan terakhir perlakuan K yaitu perlakuan tanpa penambahan bakteri apapun dengan SR 50%.

Keberhasilan probiotik *B. firmus* dalam mengatasi dan mencegah serangan *A. hydrophila* disebabkan oleh kemampuan

menyeimbangkan populasi mikroba pada media budidaya. Proses penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila* pada media budidaya juga dapat melalui kompetisi ruang dan nutrisi antara probiotik *B. firmus* dan *A. hydrophila* sehingga patogen ini tidak mampu mencapai quorum untuk dapat menyebabkan sakit bagi ikan uji.

Probiotik *B. firmus* merupakan bakteri pelarut fosfat yang dapat memproduksi fitohormon diantaranya enzim fitase. Setiap pakan ikan mengandung asam pitat yang tidak dapat dicerna oleh tubuh, sehingga pada akhirnya akan diekskresikan oleh ikan. Enzim fitase (*myo-inositol hexaphosphate hydrolase*) yang dihasilkan oleh *B. firmus* memiliki kemampuan dalam memotong golongan ortofosfat dari asam pitat yang ada dalam pakan baik yang ada di media budidaya, di dalam tubuh ikan maupun yang sudah diekskresikan oleh ikan hingga menjadi fosfat anorganik (Debnath *et al.*, 2005) yang dapat dimanfaatkan oleh probiotik *B. firmus* menjadi sumber nutrisi untuk pertumbuhan. Di sisi lain bahan baku ini tidak dapat dimanfaatkan oleh *A. hydrophila* yang tidak dapat memproduksi fitohormon. Oleh karenanya hal ini menjadikan keuntungan dari probiotik *B. firmus* dalam hal persaingan nutrisi dengan *A. hydrophila*. Probiotik *B. firmus* yang juga merupakan bakteri heterotrof bisa memanfaatkan nutrisi yang digunakan juga oleh *A. hydrophila* namun memiliki sumber nutrisi lain yang *A. hydrophila* itu sendiri tidak mampu memanfaatkan fosfat sebagai sumber nutrisinya. Dengan kemampuan inilah maka *Bacillus* sp seringkali dimanfaatkan untuk penguasaan substrat polimer organik, memperbaiki kualitas air, mengurai jumlah bakteri patogen melalui penyeimbang populasi mikroba serta meningkatkan kesehatan dan pertumbuhan inang (Irianto, 2005).

Pada sampling ke-7 tahap ini ditemukan koloni probiotik *B. firmus* pada darah ikan hingga kepadatan  $10^5$ cfu/ml. Namun demikian *A. hydrophila* tidak ditemukan pada darah ikan uji, walaupun bakteri ini masih terdeteksi dalam jumlah besar pada media budidaya. Probiotik *B. firmus* juga memiliki kemampuan dalam meningkatkan imunitas tubuh ikan uji. Sesuai dengan Lomakova (2005), *B. firmus* dapat merangsang untuk memproduksi interleukin sehingga memacu antibodi, berperan sebagai immunostimulator (Prokesova, 1998) dan meningkatkan kelangsungan hidup ikan lele dengan aplikasi probiotik *B. firmus* melalui pencampuran pakan (Sucitra, 2011).

## KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah bahwa kandidat probiotik *B. firmus* mampu menghambat patogen *A. hydrophila* secara *in vitro* pada media agar dan *in vivo* yang diaplikasikan pada media budidaya dengan pemberian setiap dua hari sekali selama 2 minggu tanpa melakukan pergantian air media budidaya mampu mencegah dan mampu mengatasi serangan *A. hydrophila* sehingga kelangsungan hidup ikan uji mencapai 75%.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ir. Angela Mariana Lusastuti, M.Si, yang telah membantu membiayai penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Cowan, S.T and Steel's. 1974. Manual for The Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press, London.238 pp.
- Debnath, D., N. P. Sahu, A.K. Pal, K. Baruah, S. Yengkokpam and S. C. Mukherjee. 2005. Present scenario and future prospects of phytase in aquafeed (Review). *Asian-Aust. J. Anim.Sci.* 18(12): 1.800-1.812.
- Feliatra, I., Efendi, E. Suryadi. 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. *Jurnal Natur Indonesia* 6(2): 75-80.
- Frerichs, G.N. and S.D. Millar. 1993. Manual for The Isolation and Identification of Fish Bacterial Pathogens. Pisces Press. Stirling. 60 pp.
- Fuller, R. 1992. Probiotics The Scientific Basic. Chapman & Hall. New York.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. William. 1998. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore. 565 pp.
- Irianto, A. 2005. Probiotik Akuakultur. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. 125 hlm.
- Lomakova, I., P. Petraskova, I. Sterzl and L. Prokesova. 2006. Immunomodulatory effects of *Bacillus firmus* on mouse peritoneal cells *in vitro*. *Folia Microbiologica*. Institute of Microbiology Czechoslovak Academy. 51(3): 243-247.
- Lusastuti, A.M. 2010. Screening dan aplikasi probiotik untuk pengendalian penyakit air tawar. Seminar Hasil Penelitian. Balai Penelitian Perikanan Air Tawar. Bogor.
- Moriarty D.J.W. 1999. Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria Dalam: Bell C.R., Brylinsky M., dan Johnson\_Green P. (Ed.) Microbial Biosystem: New Frontiers, Proceedings of The 8<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada. 7 hlm.
- Prokesova, L., V. Novotna, P. Mickova and L. Stankova. 1998. Effect of *Bacillus firmus* on antibody formation after mucosal and parental immunization in mice. *Immunology*. 64:161-166.
- Sucitra, Z. 2011. Pengaruh penambahan bakteri probiotik (*Bacillus firmus*) pada media pemeliharaan terhadap ketahanan benih lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang diinfeksi bakteri *A. hydrophila*. [Skripsi]. Jatinangor; Program Sarjana, Univeristas Padjajaran.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000. Probiotis Bacteria As Biological Control Agents in Aquaculture. *Journal Microbiology and Molecular Biology Review*. Dec. 64: 655-671.