

PENAPISAN BAKTERI PROBIOTIK DAN PERANANNYA TERHADAP INFEKSI BUATAN *Vibrio harveyi* PADA UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*)

Screening of probiotic bacteria and its role on artificial infection of *Vibrio harveyi* in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Sukenda, A J Sihombing, Fitria Novianti dan Widanarni

Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

Probiotic was screened from 28 strains of normal bacterial flora isolated from rearing water in a *Litopenaeus vannamei* farm based on its inhibitory activity against the growth of *Vibrio harveyi*. Antibacterial activity was also tested in vivo to *V. harveyi* in *L. vannamei*. The result showed that the probiotic has a antibacterial effect on *V. harveyi*. The in vivo test showed that shrimps injected with probiotic previously before challenged with *V. harveyi* has survival higher than control. Probiotic isolate was suspected as *Vibrio furnissi*.

Keywords: biocontrol, inhibitory activity, *Vibrio furnissi*, *Vibrio harveyi*, *Litopenaeus vannamei*

ABSTRAK

Bakteri probiotik ditapis dari 28 strain bacteria flora yang diisolasi dari air pemeliharaan udang vaname *Litopenaeus vannamei* berdasarkan aktivitas penghambatannya terhadap pertumbuhan *Vibrio harveyi*. Aktivitas bakteri probiotik juga diuji secara in vivo terhadap *V. harveyi* pada udang putih. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri probiotik isolat memiliki kemampuan antibakteria terhadap *V. harveyi*. Uji in vivo menunjukkan bahwa udang yang diinjeksi probiotik sebelum diuji tantang dengan *V. harveyi* memiliki kelangsungan hidup lebih tinggi daripada kontrol. Isolat probiotik tersebut diduga adalah *Vibrio furnissi*.

Kata kunci: biokontrol, aktivitas penghambatan, *Vibrio furnissi*, *Vibrio harveyi*, *Litopenaeus vannamei*

PENDAHULUAN

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) merupakan salah satu jenis udang yang pada mulanya dibudidayakan di belahan bumi barat (western hemisphere). Keunggulan udang vanname antara lain dapat memijah secara spontan, mudah berkembang biak, serta dapat dibudidayakan dengan kepadatan tinggi. Di Indonesia sebelum tahun 2000 petambak udang lebih memilih udang windu sebagai komoditas budidaya. Akan tetapi akibat sering terjadi kegagalan panen yang disebabkan oleh penyakit maka banyak petani beralih untuk membudidayakan udang vannamei. Pemerintah melalui Surat Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan No. 41/2001 tanggal 12 Juli 2001 secara resmi melepas udang vannamei sebagai varietas unggul untuk dibudidayakan di Indonesia.

Seperti pada budidaya udang windu, pada budidaya udang vannamei juga penyakit sampai saat ini masih merupakan masalah yang serius. Penurunan kualitas lingkungan sebagai akibat dari intensifikasi budidaya udang menyebabkan air laut terkontaminasi oleh berbagai mikroba berbahaya bagi udang. Salah satu mikroba berbahaya tersebut adalah bakteri *Vibrio* sp., penyebab penyakit vibriosis yang dapat menyebabkan kematian massal pada udang budidaya.

Upaya yang sering dilakukan oleh petambak untuk mengendalikan penyakit vibriosis adalah dengan menambahkan senyawa antimikrobia pada pakan atau langsung pada air. Akan tetapi pemakaian dalam jumlah besar dapat mengakibatkan resistensi bakteri patogen (Moriarty, 1999). Dengan demikian penggunaan antibiotik untuk mengontrol mikroba patogen tidak dianjurkan. Apalagi dikhawatirkan terdapat

residu antibiotik dalam tubuh udang yang akan membahayakan manusia apabila mengkonsumsinya. Salah satu alternatif yang dapat dilakukan adalah dengan menggunakan probiotik.

Probiotik adalah organisme hidup yang ditambahkan ke dalam sistem budidaya dengan maksud memperbaiki kualitas air, memperbaiki penggunaan pakan, memperbaiki respon imun, dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Verschuere, 2000). Untuk menekan pertumbuhan *V. harveyi* diperlukan bakteri yang berfungsi sebagai probiotik. Bakteri ini bisa didapat dari lingkungan budidaya udang dimana memiliki kesesuaian habitat baik dengan *V. harveyi* maupun udang sehingga diharapkan tingkat keberhasilannya akan tinggi.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat bakteri yang memiliki potensi sebagai probiotik untuk menekan atau menghambat pertumbuhan *V. harveyi* yang menyebabkan penyakit kunang-kunang.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan di Laboratorium Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor dan di tambak udang intensif di Desa Bakau Heni, Kecamatan Panengahan, Kabupaten Lampung Selatan, Provinsi Lampung.

Dalam penelitian ini dilakukan pengujian secara *in vitro* dan *in vivo*. Alat yang digunakan dalam penelitian secara *in vitro* adalah spektrofotometer, mikropipet, tabung apendof, cawan petri, tabung reaksi, tabung ulir, autoklaf, dan penangas. Bahan yang digunakan adalah media TCBS (*Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose*). dan SWC (*Sea Water Complete*) serta larutan PBS pH 7,0 – 7,4.

Alat dan bahan yang digunakan dalam uji *in vivo* adalah akuarium, aerasi, isolat *V. harveyi* MR5339Rf^R, udang vannamei (dengan berat rata-rata 13 gram per ekor), pakan udang komersial, air laut, kaporit (clorine 60% w/w), akuarium (50x30x35 cm³), bak penampungan, refraktometer, pompa, selang, batu aerasi, jarum suntuk,

thermometer, mikropipet, tabung mikro, dan cawan Petri.

Uji *In Vitro*

Uji *in vitro* dilakukan beberapa langkah, pertama dengan mengisolasi bakteri kandidat probiotik dari perairan tambak. Sampel air diambil di tiga titik yaitu di petakan tambak; tandon air masuk, dan tandon air buang. Sampel disebar pada media agar SWC selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Berdasarkan penampakan jenis koloni yang tumbuh, koloni yang berbeda secara visual dipisahkan untuk mendapatkan isolat murni. Langkah kedua melakukan uji daya hambat kandidat probiotik terhadap pertumbuhan *V. harveyi* MR5339Rf^R dengan metoda Kirby-Bauer. Kertas cakram direndam dalam suspensi kandidat probiotik kemudian diletakkan di atas media yang telah disebar *V. harveyi* MR5339 Rf^R dan diinkubasi 24 jam pada suhu kamar. Isolat yang menghasilkan zona hambat merupakan kandidat probiotik. Uji *in vitro* dilanjutkan dengan kultur bersama bakteri *V. haveyi* MR5339Rf^R dengan calon bakteri probiotik. Suspensi isolat kandidat probiotik dan *V. haveyi* MR5339Rf^R dengan densitas optik (OD) yang sama dicampur dengan dengan perbandingan 1:1. Sebanyak 0,1 ml disebar ke media agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang dan selanjutnya dihitung jumlah masing-masing koloni bakteri.

Selain itu dilakukan uji sensitivitas bakteri kandidat probiotik dengan cara menyebarkan isolat pada agar SWC yang telah dicampur dengan 50 µg/ml antibiotik rifampisin. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang, respon resintensi positif akan diketahui dengan melihat adanya pertumbuhan koloni pada media yang digunakan. Sensitifitas kandidat probiotik penting untuk diketahui agar dapat dibedakan dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R.

Uji *In Vivo*

Uji *In vivo* yang dilakukan adalah uji patogenitas kandidat probiotik, uji daya hambat kandidat probiotik terhadap *V. harveyi* MR5339Rf^R, dan identifikasi kandidat probiotik.

Uji patogenitas kandidat probiotik dilakukan dengan tiga perlakuan dan dua ulangan yaitu penyuntikan bakteri kandidat probiotik 10^6 cfu/ekor udang, penyuntikan *V. harveyi* MR5339Rf^R 10^6 cfu/ekor udang, dan penyuntikan larutan PBS 0,1 ml. Pengamatan dilakukan selama tujuh hari dengan parameter pengamatan sintasan dari udang uji.

Uji daya hambat kandidat probiotik terhadap *V. harveyi* MR5339Rf^R dilakukan dengan tiga perlakuan dan dua ulangan yaitu penyuntikan kandidat probiotik $10^4, 10^5, 10^6$ cfu/ekor udang dan penyuntikan larutan PBS 0,1 ml. Enam jam kemudian masing-masing kelompok udang diuji tantang dengan penyuntikan *V. harveyi* MR5339Rf^R 10^6 cfu/ekor udang. Pengamatan dilakukan selama tujuh hari dengan parameter pengamatan sintasan dari udang uji.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji *In Vitro*

Isolasi dan pemurnian bakteri dari lingkungan tambak

Isolat bakteri yang diperoleh dari perairan di tambak intensif Desa Bakauheni, Panengahan, Lampung Selatan ada 28 isolat. Isolat-isolat tersebut diperoleh dari sampel air di petakan tambak, tandon air masuk, dan tandon air buang serta tubuh udang yaitu hepatopankreas dan saluran pencernaan. Isolat yang memiliki penampakan koloni yang berbeda secara visual dipisahkan untuk mendapatkan isolat murni yang akan dikaji lebih lanjut. Untuk mengetahui apakah isolat berasal dari genus *Vibrio* atau bukan, isolat tersebut digores pada media selektif TCBS. Kode, asal dan morfologi masing-masing isolate tersaji dalam Tabel 1.

Uji daya hambat kandidat probiotik terhadap *V. harveyi* MR5339 dengan metode Kirby-Bauer.

Dari hasil seleksi *in vitro* terhadap 28 isolat bakteri dengan menggunakan metode Kirby-Bauer (Lay, 1994) didapat 4 isolat

kandidat probiotik yang mampu menghasilkan zona hambat terhadap pertumbuhan *V. harveyi* MR5339Rf^R yaitu isolat dengan kode 6, 13, 15 dan R3 (Tabel 2). Penghambatan pertumbuhan *V. harveyi* MR5339 Rf^R oleh bahan antimikrobal yang dihasilkan kandidat probiotik terlihat sebagai wilayah jernih sekitar pertumbuhan *V. harveyi* MR5339 Rf^R. Isolat 13 dan 15 merupakan isolat dari genus *Vibrio* yang tumbuh dalam media TCBS dengan koloni berwarna kuning, sedangkan 6 dan R3 adalah isolat bukan genus *Vibrio* dan tidak tumbuh dalam media TCBS. Luas wilayah jernih merupakan petunjuk kepekaan *V. harveyi* MR5339 Rf^R terhadap bahan antimikrobal. Selain itu wilayah tersebut juga berkaitan dengan kecepatan difusi bahan antimikrobal dalam medium. Kecepatan berdifusi ini harus diperhitungkan dalam penentuan kemampuan bahan antimikrobal (Lay, 1994).

Uji kultur bersama bakteri *V. harveyi* MR5339Rf^R dengan kandidat probiotik.

Hasil penghambatan *in vitro* dengan kultur bersama antara *Vibrio* sp. kandidat probiotik dan *V. harveyi* MR5339Rf^R disajikan dalam Tabel 3. Isolat *Vibrio* sp. (13) menunjukkan hambatan yang terbaik. Setelah inkubasi 24 jam hanya 2.5×10^5 cfu/ml bakteri *V. harveyi* MR5339Rf^R yang tumbuh dibandingkan dengan biakan kontrol (hanya diisolasi dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R) jumlah koloni yang tumbuh mencapai 1.7×10^7 cfu/ml. Kandidat probiotik *Vibrio* sp. (13) ini berwarna kuning pada media TCBS, dan pada uji kultur bersama dominansi warna kuning tersebut dapat dilihat dibandingkan dengan warna hijau menyala yang menjadi ciri *V. harveyi* MR5339Rf^R.

Uji *In Vivo*

Uji patogenisitas *Vibrio* sp. [13]

Uji *in vivo* ini hanya menggunakan bakteri yang terbaik dalam menghambat pertumbuhan *V. harveyi* MR5339Rf^R pada uji *in vitro* yaitu *Vibrio* sp. (13). Sintasan udang pada uji patogenitas *Vibrio* sp. (13) tersaji pada Gambar 2.

Tabel 1. Kode, asal dan morfologi isolat bakteri yang diperoleh dari perairan tambak.

No	Kode Isolat	Asal Isolat	Morfologi Koloni		
			Warna	Bentuk	Tepian
1	1a	Inlet	PH	MB	Halus
2	1b	Inlet	PK	MT	Karang
3	2	Outlet	PK	MT	Halus
4	3	Inlet	PTr	MY	Karang
5	5	Outlet	PTr	MT	Karang
6	6	Inlet	PK	MB	Karang
7	7	Tambak	PTr	MY	Karang
8	8	Tambak	PK	MB	Halus
9	9	Inlet	PH	MT	Karang
10	10	Tambak	PH	MT	Karang
11	11	Tambak	PTr	MY	Karang
12	12a	Tambak	KK	MB	Halus
13	12b	Tambak	KK	MB	Halus
14	13	Tambak	KN	MB	Halus
15	14	Outlet	KN	MB	Halus
16	15	Tambak	PK	MB	Halus
17	16	Tambak	PK	MB	Halus
18	17	Outlet	KK	MB	Halus
19	18	Outlet	MR	MB	Halus
20	R1	Usus	PTr	MY	Karang
21	R2	Hepatopankreas	PH	MT	Karang
22	R3	Hepatopankreas	PH	MT	Karang
23	R4a	Hepatopankreas	PH	MT	Karang
24	R4b	Hepatopankreas	PH	MT	Karang
25	R6a	Hepatopankreas	PH	MT	Karang
26	R6b	Usus	PTr	MY	Halus
27	R7	Usus	PH	MT	Karang
28	R8	Usus	PK	MY	Karang

Keterangan :

PK = Putih krem

PH = Putih

PTr = Putih transparan

KK = Kuning krem

KN = Kuning

MR = Merah

MB = Membulat

MT = Menyebar tidak rata

MY = Menyebar

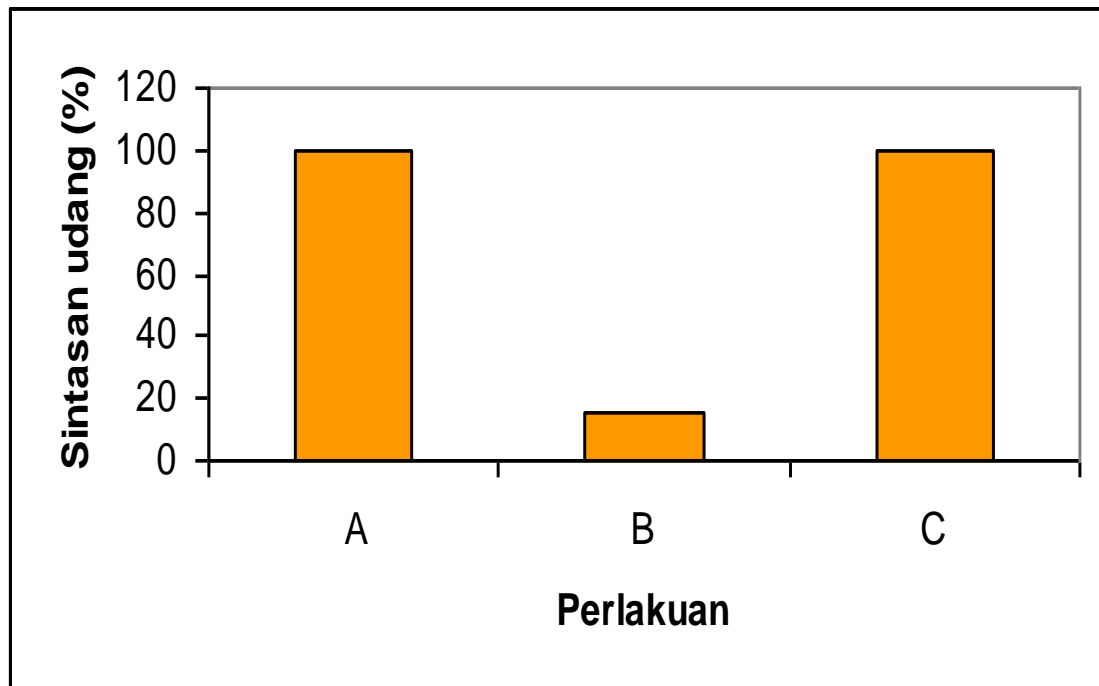
Tabel 2. Hasil pengamatan zona hambat bakteri kandidat probiotik.

Kode Isolat	(6)	(13)	(15)	(R3)
Diameter Zona Hambat	9	6.5	6.2	6.6
Asal Isolate	Inlet	Tambak	Tambak	Hepatopankreas
Genus	Non <i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i>	Non <i>Vibrio</i>

Keterangan : diameter kertas cakram 5 mm

Tabel 3. Jumlah koloni bakteri *V. harveyi* MR5339 yang tumbuh pada media TCBS pada kultur bersama pada nilai OD yang sama (OD = 0.3)

No.	Perlakuan	Jumlah Bakteri <i>V. harveyi</i> MR5339 (cfu/ml)
1	<i>V. harveyi</i> MR5339	1.7×10^7
2	<i>V. harveyi</i> MR5339 + <i>Vibrio</i> sp. (13)	2.5×10^5
3	<i>V. harveyi</i> MR5339 + <i>Vibrio</i> sp. (15)	3.7×10^6



Keterangan :

- A : 10^6 CFU/ekor *Vibrio* sp. [13]
- B : 10^6 CFU/ekor *V.harveyi* MR5339 Rf^R
- C : Kontrol (Larutan PBS)

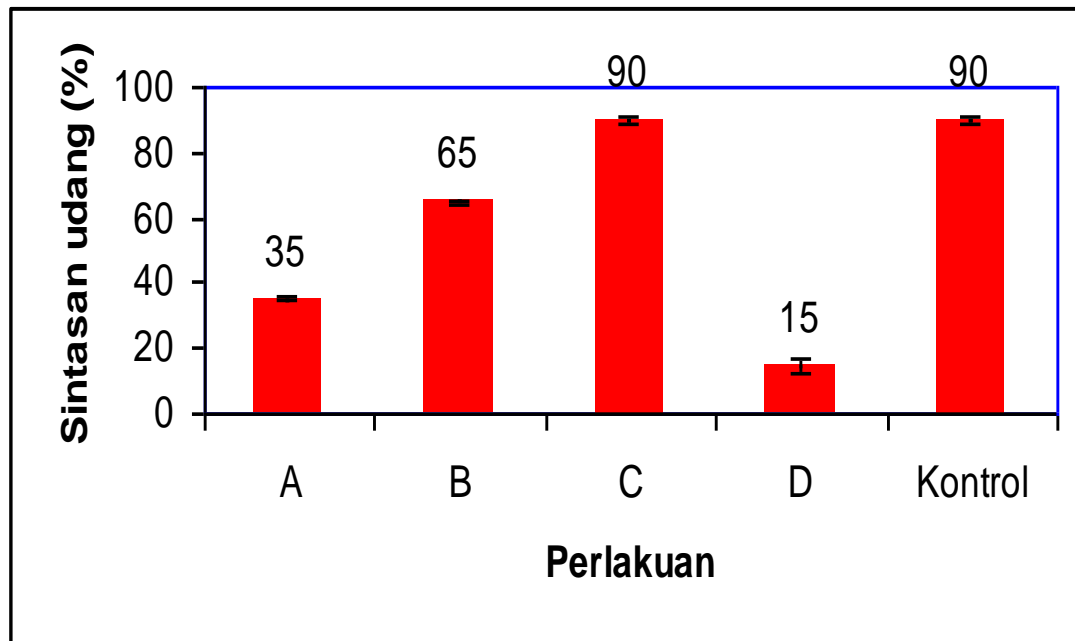
Gambar 2. Sintasan udang pada uji patogenisitas *Vibrio* sp. [13]

Pada perlakuan penyuntikan isolate *Vibrio* sp. (13) dan *Vibrio* sp. (15) dengan konsentrasi 10^6 cfu/mlekor diperoleh sintasan 100%. Sedangkan pada perlakuan *Vibrio harveyi* MR5339 diperoleh sintasan 15%. Berarti dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri *Vibrio* sp. (13) dan *Vibrio* sp. (15) tidak bersifat patogen. Probiotik adalah agen mikroba hidup yang memberikan pengaruh menguntungkan pada inang. Dengan demikian probiotik tidak boleh bersifat patogen terhadap inang baik dalam kondisi normal maupun stress (Verschuere *et al.*, 2000). Penggunaan suatu bahan antimikroba akan efektif apabila tidak hanya ampuh

membunuh patogen target tetapi harus aman bagi hewan budidaya sehingga tidak menyebabkan terganggunya pertumbuhan hewan tersebut (Wijayanti dan Suhartono, 2000).

Uji daya hambat *Vibrio* sp. [13] terhadap *V. harveyi* MR5339 Rf^R

Pada uji in vivo daya hambat bakteri kandidat probiotik terhadap pertumbuhan *V. harveyi* MR5339 Rf^R, penyuntikan kandidat probiotik sebesar 10^3 , 10^4 , 10^5 dan 10^6 cfu/ekor udang sebelum diuji tantang dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R memberikan hasil



Keterangan:

A : 10^4 CFU/ekor *Vibrio* sp. [13] + 10^6 CFU/ekor *V. harveyi* MR5339 RfR

B : 10^5 CFU/ekor *Vibrio* sp. [13] + 10^6 CFU/ekor *V. harveyi* MR5339 RfR

C : 10^6 CFU/ekor *Vibrio* sp. [13] + 10^6 CFU/ekor *V. harveyi* MR5339 RfR

D : 10^6 CFU/ekor *V. harveyi* MR5339 RfR

Kontrol : PBS

Gambar 3. Sintasan udang uji pada uji daya hambat *in vivo* *V. Harveyi* MR5339 RfR oleh *Vibrio* sp.

Tabel 4. Reaksi bakteri terhadap berbagai sumber karbohidrat

Gula-gula	Hasil reaksi	Gula-gula	Hasil reaksi
Lysine	+	Gelatin	+
Ornithine	-	Malonate	-
H ₂ S	-	Inositol	+
Glucose	+	Sorbitol	-
Manitol	+	Rhamnose	-
Xylose	+	Sucrose	+
ONPG	+	Lactose	-
Indole	-	Arabinose	+
Urease	-	Adonitol	-
VP	+	Raffinose	-
Citrate	-	Salicin	-
TDA	+	Arginine	-

sintasan udang yang lebih tinggi jika dibandingkan tanpa penyuntikan probiotik sebelumnya. Hal ini membuktikan bahwa kandidat probiotik *Vibrio* sp. (13) mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen *V. harveyi* MR5339 Rf^R dengan tingkat penghambatan terbesar dicapai pada penyuntikan kandidat probiotik 10⁶ cfu/ekor udang.

Widanarni (2000) juga telah membuktikan bahwa beberapa *Vibrio* yang diisolasi dari hatcheri udang windu menunjukkan kemampuan menghambat terhadap pertumbuhan *V. harveyi* MR5339 Rf^R. Ini berarti bahwa ada bakteri alami yang berasal dari lingkungan perairan budidaya udang yang dapat dijadikan kandidat probiotik karena mampu meningkatkan sintasan udang yang diinfeksi dengan *V. harveyi* MR5339 Rf^R.

Identifikasi kandidat probiotik

Karakter spesifik dari bakteri hasil isolasi pada penelitian ini dapat diketahui dengan melakukan uji fisiologis dan biokimia. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa bakteri kandidat probiotik memiliki karakteristik Gram negatif, motil, berbentuk batang pendek, membentuk koloni kuning pada agar TCBS, berwarna krem atau putih susu dan menyebar pada agar SWC. Sedangkan reaksi terhadap berbagai jenis karbohidrat dapat dilihat pada Tabel 4 di bawah.

Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology diduga bahwa kandidat probiotik tersebut adalah *Vibrio furnissii*. *V. furnissii* adalah bakteri yang secara alamiah ditemukan pada perairan pantai. Bakteri ini dapat diisolasi dari air, sedimen, plankton atau organisme laut.

KESIMPULAN

Isolat *Vibrio* sp (13), menunjukkan hasil paling potensial sebagai probiotik. Penyuntikan 10⁶ CFU/ekor *Vibrio* sp. [13] dapat meningkatkan sintasan udang 90% pasca uji tantang dengan *V. harveyi* MR5339. Hasil identifikasi menunjukan bakteri ini identik dengan bakteri *Vibrio furnissii*.

DAFTAR PUSTAKA

- Lay BW. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Moriarty DJW. 1999. Microbial Biosystem; New Frontiers. Di dalam: Bell CR, Brylinsky M, Johnson GP (Editor). Proceeding of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Canada.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review*, Dec. 2000: 655-671.
- Widanarni. 2004. Penapisan bakteri [ro untuk biokontrol vibriosis pada larva udang windu: konstruksi penanda molekuler dan esei pelekatan. [Tesis]. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wijayati A dan Suhartono. 2000. Penggunaan Antimikroba sebagai Pengganti Obat-Obatan untuk Mengendalikan Penyakit Udang. Laporan tahunan BBAP 1999-2000.