

## PENGARUH PENAMBAHAN BAKTERI USUS YANG BERBEDA TERHADAP KETAHANAN NON SPESIFIK IKAN MAS YANG BERASAL DARI KJA WADUK CIRATA

**Rosidah, Yuniar Mulyani, Ayi Yustiati, Ike Rustikawati**

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran, Bandung 40600

*ros\_ahdi@yahoo.com*

### ABSTRAK

Ikan Mas merupakan spesies ikan yang bernilai ekonomi tinggi, yang banyak dibudidayakan di KJA Waduk Cirata. Saat ini produksi ikan mas di waduk tersebut mengalami penurunan dibandingkan jenis ikan lain, karena ikan mas lebih rentan terhadap serangan penyakit. Organ-organ pencernaan merupakan bagian yang memegang peran penting terhadap status kesehatan ikan, karena pada organ pencernaan, terutama di usus terdapat suatu lingkungan mikro dimana terdapat banyak mikroba yang saling berinteraksi. Interaksi positif dengan inangnya dapat berpengaruh terhadap meningkatnya daya cerna dan juga sistem imun ikan (sebagai imunostimulan). Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh penambahan bakteri usus terhadap ketahanan non spesifik ikan mas yang berasal dari KJA Waduk Cirata dalam rangka memilih bakteri mana yang paling baik untuk digunakan sebagai imunostimulan atau probiotik untuk diaplikasikan di lingkungan KJA Waduk Cirata. Metode yang dilakukan diawali dengan identifikasi bakteri usus secara morfologi dan biokimia. Analisis respon imun spesifik dilakukan dengan melihat diferensial leukosit menggunakan preparat ulas darah. Hasil penelitian menunjukkan respon imun yang berbeda pada perlakuan bakteri usus yang berbeda, dan bakteri jenis *Lactic Acid Bacteria* (LAB) memberikan respon imun non spesifik terbaik dibandingkan dengan kontrol.

**Kata kunci :** Bakteri usus, ketahanan non spesifik, ikan mas, KJA Waduk Cirata

### PENDAHULUAN

Ikan Mas merupakan spesies ikan yang bernilai ekonomi tinggi, yang banyak dibudidayakan di KJA Waduk Cirata. Saat ini disana produksinya menurun dibandingkan jenis ikan lain karena ikan ini lebih rentan terhadap serangan penyakit dan lebih besar dampak kerugiannya apabila terjadi pembalikan massa air (*turn over*). Budidaya Ikan di Waduk Cirata merupakan sistem budidaya perikanan air tawar yang intensif. Semakin intensif budidaya ikan, akan semakin tinggi prevalensi (jumlah terjadinya) infeksi penyakit ikan (Rustikawati, 2012). Organ-organ pencernaan merupakan bagian yang memegang peran penting terhadap status kesehatan ikan, karena pada organ pencernaan, terutama di usus terdapat suatu lingkungan mikro dimana terdapat banyak mikroba yang saling berinteraksi antara sesamanya, dan juga berinteraksi dengan inangnya, yang dalam hal ini adalah ikan. Interaksi tersebut bisa negatif yang akhirnya akan

menyebabkan gangguan kesehatan ikan, tetapi dapat pula merupakan interaksi positif yang berpengaruh terhadap meningkatnya daya cerna dan juga sistem imun ikan (sebagai imunostimulan). Ketahanan non spesifik ikan dapat dilihat dari gambaran darah ikan (Abramson dan Melton, 2000). Nilai gambaran darah pada ikan diperlukan untuk menentukan status kesehatan ikan dan membantu diagnosis penyakit pada ikan (Salasia, 2001). Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh penambahan bakteri usus terhadap ketahanan non spesifik ikan mas yang berasal dari KJA Waduk Cirata dalam rangka memilih bakteri mana yang paling baik untuk digunakan sebagai imunostimulan atau probiotik untuk diaplikasikan di lingkungan KJA Waduk Cirata.

## METODE

### Ikan Uji

Pengujian bakteri usus pada ikan menggunakan Ikan Mas berukuran 15-30 gram yang diperoleh dari KJA Waduk Cirata, Jawa Barat. Ikan uji dipelihara pada akuarium berukuran 25x25x40 cm<sup>3</sup> dengan kepadatan 10 ekor per akuarium. Ikan yang akan diuji sebelumnya diaklimatisasi selama 2 minggu.

### Media Kultur

Bakteri usus dikultur menggunakan media NA (Nutrient Agar), NB (Nutrient Broth, MRS (de Mann, Rogosa, Sharpe) agar dan MRS broth. Untuk menentukan apakah bakteri termasuk kedalam golongan Bakteri Asam Laktat (*Lactic Acid Bacteria/LAB*), digunakan media GYPA yang ditambahkan CaCO<sub>3</sub>.

### Isolasi Bakteri Usus

Bakteri usus ikan diambil dari Ikan Mas yang dibudidayakan di KJA Waduk Cirata, yang berukuran antara 300-500 gram. pemisahan usus ikan dilakukan secara aseptis dalam laminar, kemudian usus ikan dibedah dan diambil cairan ususnya dengan menggunakan ose. Cairan usus ini dilarutkan dalam NaCl fisiologis dan dilakukan pengenceran bertingkat. Masing-masing pengenceran tersebut disebarluaskan menggunakan batang L glass pada NA dan MRS agar, dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 24-48 jam. Koloni yang tumbuh terpisah dibedakan bentuk dan warnanya, kemudian disubkultur sampai mendapatkan isolat murni.

## Karakterisasi Bakteri secara Morfologi dan Biokimia

Kultur murni bakteri usus dikarakterisasi secara morfologi dengan melihat bentuk, warna, dan tepian koloni secara makroskopis. Medium GYPA yang ditambah  $\text{CaCO}_3$  digunakan untuk membedakan apakah bakteri tersebut termasuk LAB dengan melihat zona bening pada medium. Pengujian biokimia dilakukan dengan melihat produksi  $\text{H}_2\text{S}$ , Indol, dan Katalase, serta dilakukan pengamatan motilitas bakteri.

## Uji Bakteri pada Ikan

Pemberian bakteri dilakukan dengan cara perendaman ikan uji selama 30 menit dalam air yang telah dilarutkan bakteri terpilih dengan kepadatan bakteri  $10^6 \text{ cfu/ml}$ . Setelah perendaman, ikan dipindahkan ke dalam wadah akuarium dan dipelihara selama dua minggu sebelum diperiksa lebih lanjut.

## Perhitungan Diferensial Leukosit

Ikan yang telah diuji bakteri diambil darahnya dari vena caudalis. Setelah itu dibuat preparat apus darah dan diamati pada mikroskop dengan metode Battlement (Nowak dan Duda, 1996). Darah untuk pembuatan preparat apus darah masing-masing diambil dari satu ikan pada masing-masing perlakuan bakteri.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

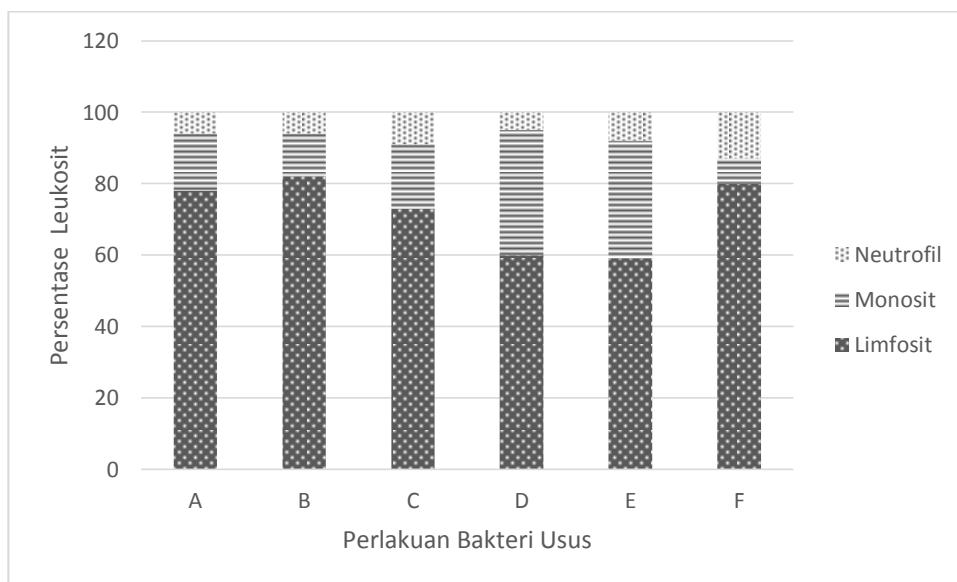
Bakteri usus yang berhasil diisolasi dari usus ikan mas yang berasal dari KJA Waduk Cirata, Jawa Barat, berjumlah 30 isolat. Lima diantaranya diuji lebih lanjut untuk dikarakterisasi dan dilihat respon imun non spesifiknya. Hasil karakterisasi bakteri usus ikan mas tersaji dalam Tabel 1.

Karakterisasi lima bakteri usus ikan mas secara morfologi dan biokimia tersaji pada Tabel 1. Dari hasil karakterisasi tersebut terlihat bentuk dan karakter bakteri yang bervariasi. Bakteri yang ditumbuhkan pada medium GYPA yang ditambah  $\text{CaCO}_3$  menunjukkan bahwa isolat 1.1 dan 2.38 menghasilkan zona bening. Artinya bahwa bakteri tersebut menghasilkan asam laktat yang mampu melarutkan  $\text{CaCO}_3$  dalam medium. Oleh karena itu isolat 1.1 dan 2.38 termasuk kedalam kelompok bakteri jenis *Lactic Acid Bacteria* (LAB).

Tabel 1. Karakterisasi Lima Bakteri Usus Ikan Mas dari KHA Waduk Cirata.

Karakter Isolat	Isolat				
	1.1	1.8	2.9	2.37	2.38
<b>Makroskopis Koloni</b>	<i>Circular, raised, entire, smooth shiny</i>	<i>Irregular, raised, entire, smooth shiny</i>	<i>Circular, convex, entire, smooth shiny</i>	<i>Circular, convex, entire, smooth shiny</i>	<i>Circular, raised, entire, smooth shiny</i>
<b>Motilitas</b>	Motil	Motil	Non Motil	Motil	Motil
<b>Uji Biokimia</b>					
- <b>Produksi H<sub>2</sub>S</b>	-	-	-	-	-
- <b>Produksi Indol</b>	-	-	-	-	-
- <b>Katalase</b>	+	+	-	+	+
<b>GYPA CaCO<sub>3</sub></b>	+	-	-	-	+

Salah satu komponen sel darah yang berfungsi sebagai pertahanan non spesifik adalah leukosit. Komponen ini bekerja dengan cara melokalisasi dan mengeliminasi patogen atau fagositosis, serta berhubungan dengan sistem kekebalan tubuh (Anderson dan Siwicki, 1993). Leukosit terbagi menjadi dua kelompok yaitu granulosit (neutrofil, eosinofil, basofil) dan kelompok agranulosit (monosit dan limfosit). Leukosit yang diamati dan dihitung dalam penelitian ini adalah limfosit, monosit, dan neutrofil.

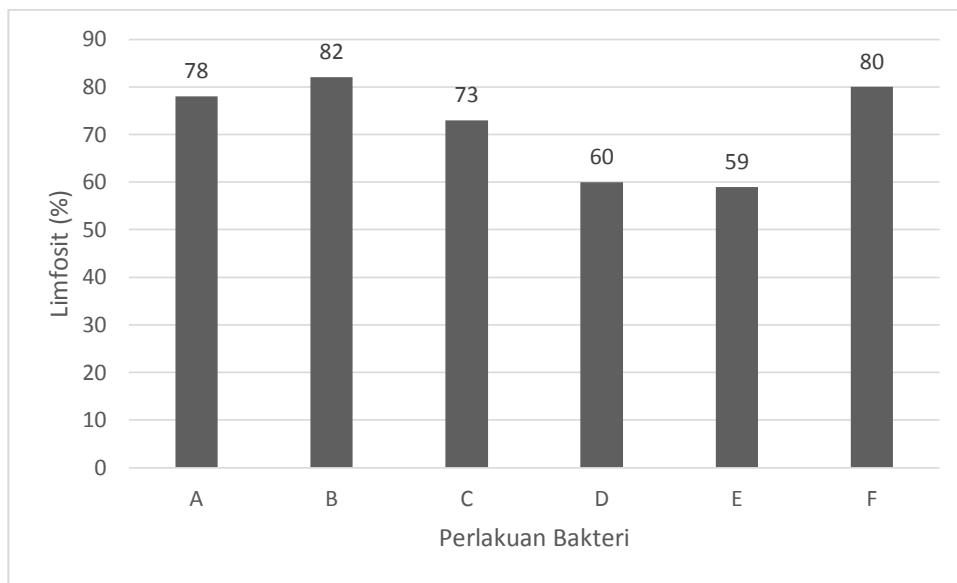


Gambar 1. Diferensial Leukosit pada perlakuan bakteri usus yang berbeda, (A) Tanpa pemberian bakteri, (B) Pemberian bakteri 1.1, (C) Pemberian bakteri 1.8,

(D) Pemberian bakteri 2.9, (E) Pemberian bakteri 2.37, (F) Pemberian bakteri 2.38.

Pada Gambar 1 terlihat bahwa perlakuan B, C dan E dapat meningkatkan jumlah sel limfosit. Peningkatan jumlah limfosit pada perlakuan tersebut diduga disebabkan adanya peran bakteri pada perlakuan tersebut dapat memicu pembentukan dan aktivitas sel leukosit, sehingga aktivitas fagositosis dan pembentukan sel-sel-leukosit meningkat.

Leukosit atau sel darah putih yang dapat membentuk sistem imun merupakan unit yang paling aktif karena berperan dalam melawan berbagai penyakit infeksi dan benda asing. Leukosit terdapat di sumsum tulang (jaringan mieloid) dan sebagian pada jaringan limfa kemudian tetap tersimpan di sumsum tulang sampai dibutuhkan disistem sirkulasi, ketika dibutuhkan akan meningkat jumlahnya. Leukosit yang dibentuk pada sumsum tulang yaitu granulosit (neutrofil dan eosinofil), monosit dan sedikit limfosit, sedangkan yang dibentuk pada kelenjar limfa yaitu agranulosit hanya pada limfosit (Guyton 1997).

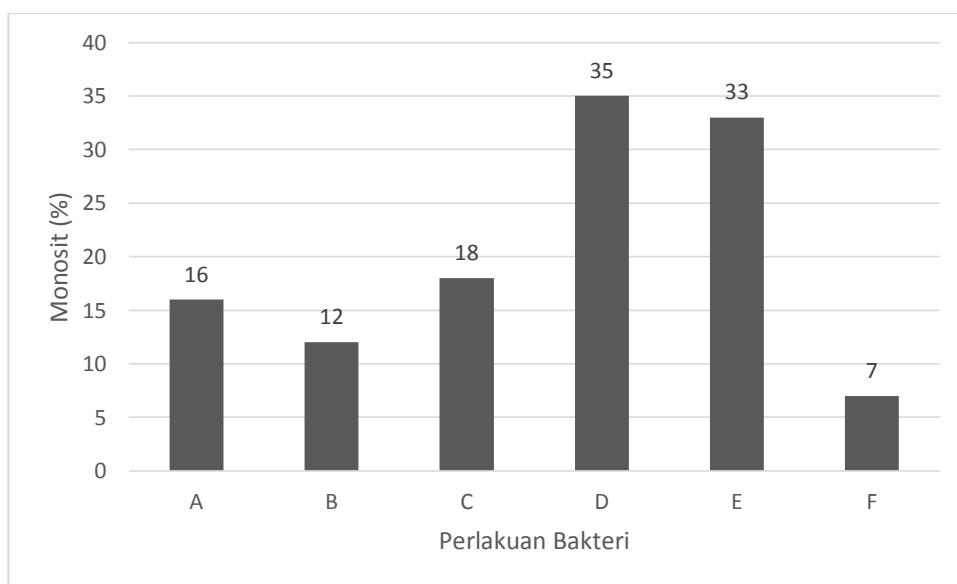


Gambar 2. Nilai Persentase Limfosit pada perlakuan bakteri usus yang berbeda, (A) Tanpa pemberian bakteri, (B) Pemberian bakteri 1.1, (C) Pemberian bakteri 1.8, (D) Pemberian bakteri 2.9, (E) Pemberian bakteri 2.37, (F) Pemberian bakteri 2.38.

Hasil pengamatan selama penelitian terhadap persentase limfosit dapat dilihat pada Gambar 2. Persentase limfosit pada perlakuan A (kontrol) sebesar

78%, perlakuan B sebesar 82%, pada perlakuan C sebesar 73%, perlakuan D sebesar 60%, pada perlakuan E sebesar 59%, dan perlakuan F sebesar 80%. Dari hasil pengamatan tersebut dapat dinyatakan, bahwa terdapat variasi dari persentase limfosit. Perlakuan B dan F telihat lebih tinggi dibanding kontrol, membuktikan bahwa bakteri dari golongan *Lactic Acid Bacteria* (LAB) memberikan dampak peningkatan limfosit yang berperan penting dalam pembentukan antibodi.

Penurunan persentase limfosit pada ikan dapat terjadi karena ikan tersebut mengalami stres karena pemeliharaan yang kurang baik atau akibat lingkungan tempat hidup ikan yang keadaannya tidak mendukung (Rachmawati *et al.*, 2010). Stres dan lingkungan yang kurang baik dapat menyebabkan peningkatan sekresi hormon kortisol, sehingga jumlah limfosit di dalam sirkulasi darah menurun.

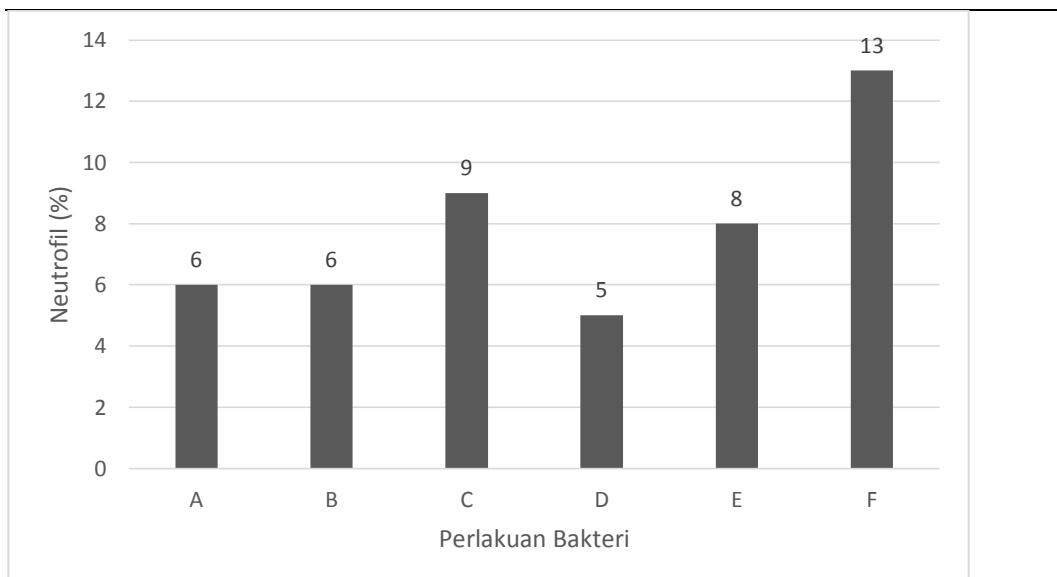


Gambar 3. Nilai Persentase Monosit pada perlakuan bakteri usus yang berbeda, (A) Tanpa pemberian bakteri, (B) Pemberian bakteri 1.1, (C) Pemberian bakteri 1.8, (D) Pemberian bakteri 2.9, (E) Pemberian bakteri 2.37, (F) Pemberian bakteri 2.38.

Persentase monosit tersaji pada Gambar 3. Persentase monosit pada perlakuan A sebesar 16%, perlakuan B sebesar 12%, pada perlakuan C sebesar 18%, perlakuan D sebesar 35%, pada perlakuan E sebesar 33%, dan perlakuan F sebesar 7%. Dari hasil pengamatan, terlihat bahwa jumlah monosit meningkat pada perlakuan D dan E, hal ini memperlihatkan pemberian bakteri 2.9 dan 2.37

dapat meningkatkan respon imun ikan terlihat dari tingginya persentase monosit. Moye dan Schute (2008) menyatakan bahwa fungsi utama monosit dalam sistem imun sebagai makrophage, yaitu menelan dan menghancurkan sel, mikroorganisme dan benda asing yang bersifat patogen dengan cara menelan dan menghancurnyanya.

Hartika dkk. (2014) menyatakan bahwa persentase monosit dapat meningkat dengan cepat setelah terinfeksi dengan benda asing. Monosit merupakan leukosit terbesar yang sering disebut juga dengan makrofag. Monosit berfungsi sebagai penanda patogen kepada sel T sehingga patogen tersebut dapat dikenali dan dibunuh atau dapat membuat antibodi. Kontak yang dekat antara permukaan limfosit dan monosit diperlukan untuk respon imunologis yang maksimal. Monositosis atau meningkatnya presentase monosit dapat terjadi akibat penyakit kronis terutama jika banyak kotoran sel yang harus disingkirkan, misalnya infeksi jamur, radang granulomatosa, dan penyakit tertentu. Monositopenia atau menurunnya presentase monosit bersifat fisiologis terjadi pada stadium awal stress, sedangkan monositopenia yang bersifat patologis terjadi setelah stadium akut suatu penyakit berakhir.



Gambar 4. Nilai Persentase Neutrofil pada perlakuan bakteri usus yang berbeda, (A) Tanpa pemberian bakteri, (B) Pemberian bakteri 1.1, (C) Pemberian bakteri 1.8, (D) Pemberian bakteri 2.9, (E) Pemberian bakteri 2.37, (F) Pemberian bakteri 2.38.

Hasil pengamatan selama penelitian terhadap persentase neutrofil dapat dilihat pada Tabel 4. Persentase neutrofil pada perlakuan A sebesar 6%, perlakuan B sebesar 6%, pada perlakuan C sebesar 9%, perlakuan D sebesar 5%, pada perlakuan E sebesar 8%, dan perlakuan F sebesar 13%. Berdasarkan hasil pengamatan pemberian bakteri 2,38 memberikan persentase neutrofil paling tinggi. Peran utama neutrofil adalah sebagai garis pertahanan pertama dalam melawan benda asing khususnya melawan infeksi bakteri (bakteri gram negatif dan beberapa bakteri gram positif), pada saat terjadi infeksi bakteri akut, bakteri akan merusak sel dan sel akan melepaskan faktor kemotaktik ke jaringan. Faktor kemotaktik tersebut akan menarik neutrofil ke dalam jaringan melalui proses diapedesis dan neutrofil akan menuju ke lokasi infeksi untuk melakukan fagositosis (Duncan dan Keith, 1977). Setelah memfagositosis benda asing neutrofil akan mencerna benda asing tersebut kemudian akan mengalami otolisis dan melepaskan zat-zat hasil degradasi ke dalam jaringan limfe. Jaringan limfe akan mengeluarkan histamin yang merangsang sumsum tulang melepaskan cadangan neutrofil sehingga produksi neutrofil akan meningkat (Meyer *et al.* 1992).

## KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan respon imun yang berbeda pada perlakuan bakteri usus yang berbeda. Bakteri jenis *Lactic Acid Bacteria* (LAB) memberikan respon imun non spesifik terbaik dibandingkan dengan kontrol.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anderson DP and Siwicki AK. 1993. Basic Hematology and Serology for Fish Health Programs. Paper presented in second symposium on diseases in Asian Aquaculture "Aquatic Animal Health and the Environment". Phuket, Thailand. 25 – 29 th October 1993. Hal 185-202.
- Guyton AC. 1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 9. Irawati Setiawan, penerjemah. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran, ECG. Terjemahan dari : *TextBook of Medical physiology*.

- Hartika, R., Mustahal, A.N. Putra. 2014. Gambaran Darah Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*) dengan Penambahan Dosis Prebiotik Yang Berbeda Dalam Pakan. Jurnal Perikanan dan Kelautan Vol. 4 No. 4 : 259-267
- Meyer DJ, Coles EH and Rich LJ. 1992. *Veterinary Laboratory Interpretation and diagnosis*. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Moyes, C.D. and P. M. Schulte. 2008. *Principles of Animal Physiology*. 2 Ed. Perarson International Edition, New York.
- Nowak, B. & S. Duda. 1996. Effects of exposure to sub-lethal levels of copper on growth and heath of sea farmed rainbow trout. Supervising scientist report. Commonwealth of Australia. ISBN 0 642 24316 6
- Rachmawati FN, Untung S, Yulia S. 2010. Respon Fisiologi Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*) yang Distimulasi dengan Daur Pemuasaan dan Pemberian Pakan Kembali. Jogjakarta: Fakultas Biologi UGM. SB/O/BF/07.
- Rustikawati I. 2012. Efektivitas Ekstrak *Sargassum* sp. Terhadap Deferensiasi Leukosit Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Diinfeksi *Streptococcus iniae*. Universitas Padjadjaran: *Jurnal Akuatik* 3 (2). ISSN 0853-2523.
- Salasia SIO, Sulanjari D, Ratnawati A. 2001. Studi hematologi ikan air tawar. Biologi 2 (12):710-723