

BAB II.

Tinjauan Pustaka

Penggunaan antibiotik dalam pakan sudah mengalami penurunan bahkan di beberapa negara melarang penggunaannya, karena sering ditemukannya residu yang akan menjadi toksik bagi konsumen dan juga membuat mikroorganisme resisten dalam tubuh manusia dan produk budidaya, terutama bakteri-bakteri patogen seperti *Salmonella*, *E coli*, *Clostridium perferingen* (Feliatra, 2002). Sekarang ini budidaya laut baik ikan maupun udang ingin *back to nature* (kembali ke alam) yang banyak diinginkan oleh konsumen. Budidaya laut yang banyak menggunakan antibiotik itu hanya menimbulkan resisten bagi organisme *patogen*. Maka salah satu alternatif yang paling aman adalah dengan menggunakan bakteri probiotik yang dikonversikan melalui pakan dan sengaja dimasukkan dalam areal budidaya tersebut.

Bakteri probiotik dapat bertahan hidup dalam saluran pencernaan setelah dikonsumsi. Bakteri ini tahan terhadap lisozim (zat pemecah dinding sel bakteri) dan asam empedu sehingga sampai ke usus dalam keadaan hidup, dan mampu melekat pada sel epithelia, dan menjaga keharmonisan komposisi bakteri saluran pencernaan. Selanjutnya bakteri ini mampu mengatasi intoleransi terhadap laktosa, mencegah diare, sembelit, kanker, hipertensi, menurunkan kolesterol, menormalkan komposisi bakteri saluran pencernaan setelah pengobatan antibiotik, serta meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Harder *et al*, 2003).

Pakan-pakan yang tidak termakan oleh ikan itu akan menumpuk di perairan tambak atau keramba sehingga akan menyebabkan pertumbuhan bakteri patogen yangakhirnya akan menimbulkan penyakit (Feliatra, 2004). Untuk itu cara mengatasi dan memperlancar proses pencernaan pada ikan salah satunya adalah dengan bantuan bakteri probiotik.

Populasi bakteri disepanjang saluran pencernaan semakin kompleks baik jenis maupun jumlahnya, dengan bertambahnya usia. Lambung hanya mengandung bakteri yang tahan terhadap asam, sebagai mana diketahui, pH lambung sangat rendah sekitar 1.7 dan bakteri laktat dapat bertahan dalam bilangan ribuan bakteri (Waspodo, 2001).

Tingginya Kewaspadaan konsumen di negara-negara maju akan makanan yang dikonsumsi terutama makanan dari hewani itu mengilhami para mariculturist untuk menciptakan formula pakan ikan yang tidak hanya mencukupi kebutuhan nutrisi (energi, asam amino, vitamin dan mineral) bagi ikan itu sendiri tetapi juga keamanan bagi konsumen terhadap makanan yang dikonsumsi.

Sebagai pengganti antibiotik sekarang berkembang probiotik yang tidak hanya digunakan untuk manusia tetapi juga bagi organisme budidaya. Probiotik dapat memberikan keuntungan (perlindungan, proteksi penyakit, perbaikan daya cerna dll) oleh suatu makhluk kepada makhluk lain. Kelecom (2002) menyatakan tentang metabolit sekunder mikro-organisme dapat digunakan sebagai antibiotik yang tidak berbahaya bagi perkembangan kehidupan di alam raya. Pada saat ternak mengalami *stres*, keseimbangan mikro-organisme dalam saluran pencernaan terganggu, mengakibatkan sistem pertahanan tubuh menurun dan bakteri-bakteri *pathogen* berkembang dengan cepat. Pemberiaan probiotik dapat menjaga keseimbangan komposisi mikro-organisme dalam sistem pencernaan ternak berakibat meningkatnya daya cerna bahan pakan dan menjaga kesehatan ternak (Fuller, 1989).

Prinsip dasar kerja probiotik adalah pemanfaatan kemampuan mikroorganisme dalam memecah atau menguraikan rantai panjang karbohidrat, protein dan lemak yang menyusun pakan yang diberikan. Kemampuan ini diperoleh karena adanya enzim-enzim khusus yang dimiliki oleh mikroba untuk memecah ikatan tersebut. Enzim tersebut biasanya tidak dimiliki oleh ikan dan makhluk air lainnya. Walaupun ada kuantitas dan kualitasnya dalam jumlah terbatas. Pemecahan molekul-molekul kompleks ini menjadi molekul sederhana jelas akan mempermudah pencernaan lanjutan dan penyerapan oleh saluran pencernaan ikan. Di sisi lain mikroorganisme pelaku pemecah ini mendapat keuntungan berupa energi yang diperoleh dari hasil perombakan molekul kompleks tersebut. (Efendi, 2002)

Hubungan simbiosis mutualis tidak mustahil ada di ekosistem perairan. Data hasil penelitian menunjukkan bahwa populasi mikroorganisme di dalam usus ikan mencapai 10^7 sel per gram isi usus, Sebagian dari mereka merupakan penghuni sejati usus, mereka dapat tumbuh dan berkembang biak pada usus tersebut (Proksch dan Ebel, 2002)

Pada saat memilih mikroorganisme yang akan dijadikan probiotik. Persyaratan yang harus dimiliki oleh mikroba probiotik antara lain adalah; a). Tidak bersifat patogen atau mengganggu si inang, tidak bersifat patogen bagi konsumen (manusia dan hewan lainnya). b). Tidak mengganggu keseimbangan ekosistem setempat. c). Mikroba tersebut hendaknya dapat dan mudah dipelihara dan diperbanyak d) Dapat hidup dan bertahan serta berkembang biak di dalam usus ikan. e) Dapat dipelihara dalam media yang memungkinkan untuk diintroduksi ke dalam usus ikan. f). Dapat hidup dan berkembang di dalam air wadah pemeliharaan ikan. (Feliatra, 2002)

Mengingat belum adanya produk komersial probiotik yang diaplikasikan secara luas untuk ikan, maka pemakaian di lapangan pada tulisan ini lebih bersifat kemungkinan yang berdasarkan hasil-hasil penelitian skala laboratorium dan interpretasi dari aplikasi pada hewan ternak lainnya. Kemungkinan pengintroduksian probiotik ke dalam usus ikan antara lain adalah; a) Melalui bahan makanan, yakni mikroba probiotik dicampur/ diaduk dengan pelet. Mikroba patogen bisa dalam bentuk suspensi atau bubuk kering. Dilihat dari sisi keutuhan pelet, maka penggunaan bentuk bubuk mikroba probiotik lebih menguntungkan. Namun patut dicatat bahwa sangat sukar menyimpan bubuk probiotik dalam waktu lama, yakni dikhawatirkan mereka akan mati. b) Perendaman benih ke dalam suspensi sel mikroba probiotik sebelum ditebar ke dalam kolam, keramba atau tambak. Melalui metoda ini diharapkan mikroba probiotik akan masuk ke dalam usus melalui mulut dan dubur. Kemudian menetap dan tumbuh di dalam usus ikan. c). Penebaran probiotik di dasar kolam dan ke dalam air wadah pemeliharaan. Metoda aplikasi ini memungkinkan bagi probiotik penghuni sejati lingkungan akuatis. Mikroba tersebut akan tumbuh dan berkembang sehingga sebagian akan masuk ke dalam saluran pencernaan ikan, menetap dan berkembang biak (Sudarmo *et al*, (2003)

Tanasomwang, *et al* (1998). mengatakan bakteri probiotik tidak membahayakan organisme karena probiotik tidak memakan sel-sel dinding pencernaan, baik yang masih hidup maupun sel yang sudah mati. Probiotik hanya memakan zat makanan yang tidak bisa dicerna oleh saluran pencernaan. Menurut Bostwick (2000) bakteri probiotik yaitu bakteri hidup yang diberikan sebagai suplemen makanan yang mempunyai pengaruh menguntungkan pada kesehatan baik pada manusia dan binatang, dengan memperbaiki keseimbangan mikroflora intestinal. Mikroflora yang digolongkan sebagai probiotik

adalah yang memproduksi Lactic terutama misalnya *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria* walaupun jenis yang lain juga ada.

Probiotik yang efektif harus memenuhi beberapa kriteria : memberikan efek yang menguntungkan pada host, tidak patogenik dan tidak toksik, mengandung sejumlah besar sel hidup, mampu bertahan dan melakukan kegiatan metabolisme dalam usus, tetap hidup selama dalam penyimpanan dan waktu digunakan, mempunyai sifat sensori yang baik, diisolasi dari host.

Efek kesehatan yang menguntungkan dari probiotik adalah : memperbaiki keluhan malabsorpsi laktosa, meningkatkan ketahanan alami terhadap infeksi di usus, supresi kanker, mengurangi kadar kolesterol darah, memperbaiki pencernaan, stimulasi imunitas gastrointestinal. Bakteri-bakteri non patogen (probiotik) yang berdomisili di usus terutama usus besar dan mengadakan kolonisasi yang membentuk mikroekosistem yang bermanfaat untuk kesehatan pejamu dalam aspek ketahanan infeksi, aspek metabolik, dan aspek imunologis.

Bakteri probiotik bertahan hidup dalam saluran pencernaan setelah dikonsumsi. Bakteri ini tahan terhadap lisozim, enzim di air liur, pemecahan dinding sel bakteri, asam, asam empedu, untuk sampai di usus dalam keadaan hidup. Dia mampu melekat pada sel epitelial, dan menjaga keharmonisan komposisi bakteri saluran pencernaan. Selanjutnya ia membantu mengatasi intoleransi terhadap laktosa, mencegah diare, sembelit, kanker, hipertensi, menurunkan kolesterol, menormalkan komposisi bakteri saluran pencernaan setelah pengobatan antibiotik, serta meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Suminto, and Hirayama. 1997).

Manfaat probiotik sebagai bahan aditif ditunjukkan dengan meningkatnya ketersediaan lemak dan protein bagi ternak, di samping itu probiotik juga meningkatkan kandungan vitamin B kompleks melalui fermentasi makanan. Samadi, 2002 mengatakan prinsip kerja dari probiotik, bakteri-bakteri probiotik bekerja secara anaerob menghasilkan asam laktat. Mengakibatkan turunnya pH saluran pencernaan yang menghalangi perkembangan dan pertumbuhan bakteri-bakteri patogen. Bakteri-bakteri

patogen mendiami daerah dinding pencernaan untuk mengembangkan penyakit, bakteri-bakteri probiotik mendiami mukosa pencernaan yang juga berakibat perubahan komposisi dari bakteri yang terdapat dalam saluran pencernaan. Waspodo, 2001 mengatakan Populasi bakteri disepanjang saluran pencernaan semakin kompleks baik jenis maupun jumlahnya, dengan bertambahnya usia. Lambung hanya mengandung bakteri yang tahan terhadap asam, sebagai mana diketahui, pH atau keasaman lambung sangat rendah, sekitar 1,7. Legowo, 2002 mengatakan bakteri probiotik dapat mencegah kanker. Misalnya aspek yang berkaitan dengan pengikatan mutagen, deaktivasi dan penghambat karsinogen, respon kekebalan dan pengaruh konsentrasi garam empedu.

Penambahan probiotik terhadap pakan memberikan pengaruh positif terhadap organisme budidaya seperti peningkatan kemampuan cerna pada turbot (Schrjver dan Olivier, 2000). Penggunaan probiotik pada akuakultur merupakan konsep baru, dimana peneliti dunia sudah mengarahkan sebagai pengontrol penyakit (Austin et al, 1995, Skjermo dan vedstein, 1999), Data yang menunjukkan probiotik yang mampu membantu sistem pencernaan dan pertumbuhan masih sangat terbatas.

Studi keanekaragaman genetik pada prinsipnya bertujuan untuk mengkaji komposisi genetik individu di dalam atau antar populasi dan untuk mengetahui faktor-faktor yang menyebabkan terjadinya modulasi atau dinamika keanekaragaman genetik dari populasi tersebut. Secara umum keanekaragaman genetik pada suatu populasi dapat terjadi karena gen mengalami mutasi, rekombinasi, dan perpindahan sekelompok populasi dari suatu tempat ke tempat yang lain (Griffitns *et al.*, 1996).

Ribosom merupakan komponen sel yang utama dengan jumlah sekitar 20.000 ribosom per sel. Ribosom tersebut mengandung kira-kira 10 % dari seluruh total protein dan sekitar 80 % dari keseluruhan massa sel. Sel bakteri mempunyai ribosom 70S yang terdiri dari unit ribosomal kecil 30S mengandung 21 protein dan satu molekul 16S rDNA yang panjangnya 1541 basa. Unit ribosomal besar 50S mengandung 31 protein, satu molekul 23S rDNA yang panjangnya 2904 basa dan satu molekul 5S rDNA yang panjangnya 120 basa (Ayuso-Sajido dan Genilloud, 2004)

Gen 16S rDNA merupakan komponen penting dalam sel dan sangat menguntungkan di dalam analisis filogenik, karena terdiri dari daerah-daerah yang

dikonservasi sehingga mutasi akan terbatas. studi sistematika bakteri pada tingkat famili, genus, spesies, ataupun subspecies (Chen et al., 2000).

Metsa-Ketela et al, 2002, menyatakan bahwa 16S rDNA sangat mudah penanganannya dari pada 23S rDNA, maka 16S rDNA lebih sering digunakan untuk melihat perkembangan filogenetik prokariota dan beberapa pada eukariota. 16S rDNA terdapat pada semua prokariota dan memiliki bagian atau sekuen konservatif dan sekuen lainnya sangat bervariasi. Sabdono, (2001) menambahkan bahwa sekuen nukleotida 16S rDNA tidak hanya memudahkan pemahaman yang lebih baik pada filogenetik mikroba. Namun juga memudahkan identifikasi bakteri dari sampel lingkungan.

Penerapan filogenetik molekuler pada ekologi mikroba menunjukkan adanya diversitas prokariotik yang terjadi secara alami. Lebih dari 16.000 sekuen gen 16S rDNA dari berbagai spesies bakteri telah disimpan dalam *Gen Bank*. Gen 16S rDNA mempunyai daerah sekuen yang dikonversi, sehingga dapat digunakan untuk menduga hubungan kekerabatan secara alami antar spesies yang mempunyai kekerabatan jauh serta dapat digunakan untuk membedakan spesies yang mempunyai kekerabatan dekat dari berbagai daerah (Radjasa, 2006)

Sekuen gen 16S rDNA dari mikroorganisme yang baru ditemukan dapat dibandingkan dengan pustaka sekuen 16S rDNA dari mikroorganisme lain melalui program pelacakan *Database Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* (Altschul et al., 1997). Penggunaan gen 16S rDNA untuk mengetahui hubungan filogenetik banyak diterapkan pada berbagai lingkungan yang berbeda. Beberapa *database* yang lain, seperti : *Gen Bank* (USA) yang dikenal antara lain *The Genome Sequen Data Base (GSDB)*, *The European Molecular Biology Laboratory Data Library (EMBL)*, dan *DNA Data Bank of Japan (DDBJ)* bersama-sama memberikan informasi terhadap koleksi terbaru dari sekuen DNA (Sabdono, 2001).

PCR adalah suatu metode *in vitro* yang digunakan untuk mensintesis secara enzimatik sekuen tertentu DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) dengan menggunakan dua primer oligonukleotida yang menghibrid pita yang berlawanan dan mengapit daerah target DNA. *Polymerase Chain Reaction (PCR)* ini secara garis besarnya terdiri dari tiga tahap utama yaitu tahap *denaturasi* untuk memisahkan DNA menjadi utas tunggal, *annealing* yaitu proses penempelan primer, dan *ekstensi* yaitu proses pemanjangan DNA baru (Thiel dan Imhoff, 2003).

Langkah-langkah awal untuk menganalisis DNA adalah memecah genom DNA menjadi fragmen-fragmen yang spesifik yang berukuran kecil. Secara alami DNA adalah suatu molekul primer yang keberadaannya selalu terkait dengan RNA dan protein. Sedangkan dalam menganalisis, DNA yang diperlukan adalah DNA murni. Ekstraksi dan pemurnian DNA berlangsung dalam lima tahapan kegiatan yaitu penghancuran sel, penghilangan RNA, pengendapan protein, pengendapan RNA dan hidrasi DNA. Ekstraksi gen dilakukan dengan memisahkan genom DNA dari molekul-molekul lain yang ada dalam jaringan. Secara alami keberadaan molekul DNA selalu terkait dengan RNA dan protein, sehingga keduanya dapat bertindak sebagai kontaminan dalam proses perifikasi (Radjasa, 2006).

Menurut Yuwono (2006), PCR merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut. Prosesnya dilakukan dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu termosikler. Panjang target DNA berkisar antara puluhan sampai ribuan nukleotida yang posisinya diapit sepasang primer. Primer yang berada pada daerah sebelum daerah target disebut sebagai primer *forward* dan yang berada setelah daerah target disebut primer *reverse*. Enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA baru dikenal sebagai enzim polymerase. Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR, diperlukan juga dNTPs yang mencakup dATP (nukleotida berbasis adenine), dCTP (sitosin), dGTP (guanin), dan dTTP (timin).

Menurut Yuwono (2006) setiap tahap pada siklus PCR memerlukan periode waktu tertentu untuk dapat efektif. Pada tahap *denaturasi* yaitu saat untai ganda DNA dipisahkan menjadi untai tunggal diperlukan waktu standar 90 detik pada suhu 94° C, tahap *annealing*, ketika tahap primer berkomplemen dengan salah satu untai tunggal. Suhu dan waktu yang digunakan bergantung pada komposisi GC. Pada komposisi GC primer maka suhu *annealing* akan lebih baik kalau ditambah. Panjang primer yang digunakan sebaiknya berkisar antara 20 hingga 30 panjang basa. Semakin panjang primer yang digunakan maka semakin spesifik daerah DNA yang akan diamplifikasi. Pada proses ekstensi sintesa DNA, suhu yang digunakan adalah 72°. Suhu ini merupakan suhu optimal bagi enzim *taq* polimerase DNA. Lamanya tahap ekstensi untuk beberapa kilobasa disarankan waktu minimal yang digunakan tiga menit. Untuk sekuens yang

lebih panjang lagi waktu ekstensi perlu ditingkatkan hingga 15 menit. Tetapi waktu yang lebih lama lagi tidak memberikan hasil yang lebih baik.

Teknik PCR didasarkan pada siklus yang berlangsung dari temperatur tinggi hingga templet terdenaturasi pada suhu 94°C hingga 97°C . penempelan primer oligonukleotida pada suhu antara 55° hingga 72°C . pengulangan siklus temperature ini dilakukan sebanyak 25 hingga 45 kali (Pirae dan Vining, 2002).

Elektroforesis dengan gel agarose merupakan metode yang sederhana dan sangat efektif untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen DNA dengan panjang 0,5 hingga 25 kilo pasang basah (kpb). Metode elektroforesis ini dapat dikelompokkan menjadi tiga langkah ; pertama, persiapan gel agarose dengan konsentrasi agarose yang disesuaikan dengan ukuran DNA fragmen yang akan dipisahkan. Kedua, DNA sampel dimasukkan kedalam lubang gel dan gel diletakan di bak elektroforesis yang dialiri listrik dengan tegangan dalam waktu tertentu sehingga menghasilkan pemisahan yang baik. Pada tahap tiga, gel direndam dalam *ethidium bromide*, atau etidium bromida yang telah digunakan pada gel dan penyangga elektroforesis. Hasil elektroforesis ini dapat dilihat langsung pada penyinaran dengan UV (Yuwono, 2006).

Menurut Radjasa (2006), pada prinsipnya DNA dapat berintegrasi di dalam gel dalam bentuk padat yang di letakan dalam larutan penyangga yang dialiri arus listrik. Salah satu gel yang biasa digunakan adalah gel agarose. Gel agarose dapat dicetak dengan memanaskan agarose yang dilarutkan dalam larutan penyangga sampai larutan jernih. Larutan yang masih cair (dengan temperatur sekitar 60°C) dituangkan kedalam pencetak gel. Segera setelah itu, sisir ditempatkan di dekat tepian gel dan gel dibiarkan mengeras. Apabila gel telah mengeras, sisir dicabut sehingga membentuk lubang-lubang yang digunakan untuk menempatkan larutan DNA. Jika gel ditempatkan ke dalam bak elektroforesis yang mengandung larutan penyangga dan bak tersebut dialiri arus listrik, molekul DNA yang bermuatan negatif pada pH netral bergerak (bermigrasi) kearah positif (anoda). Kecepatan migrasi molekul DNA ditentukan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah ukuran molekulnya. Migrasi molekul DNA berukuran besar lebih lambat daripada migrasi molekul berukuran kecil.