

**STUDI EKOLOGI MOLEKULER PADA MICROFLORA
DI INTESTINE IKAN**

**PROGRAM STUDI ILMU PERIKANAN
PASCA SARJANA PERTANIAN
NIHON UNIVERSITY**

Program Doktor

Maidie Asfie

2000

Daftar Isi

BAB 1. Intisari.....	Halaman	1
BAB 2. Analisis Microflora Intestine pada Ikan-ikan Pantai dan Ikan Maskoki		8
BAB 3. Analisis Microflora Intestine Ikan dengan Menggunakan Metode FISH		14
BAB 4. Perubahan Harian Microflora Intestine Ikan Air Tawar		25
BAB 5. Perubahan Microflora Intestine Ikan Sesuai Bagian Saluran Pencernaan		31
BAB 6. Kesimpulan Umum		38
Ucapan Terimakasih		43
Daftr Pustaka		44

BAB 1. Dasar Teori Utama

Di permukaan Bumi: air, tanah, dan udara mengandung bakteri yang masing-masing memiliki ciri khusus (disebut bacterial flora atau microflora). Microflora hidup pada makhluk hidup lain baik di permukaan dan di dalam tubuh, yang akibat dari ini akan menyebabkan munculnya ciri-ciri khusus yang beragam. Misal, intestine pada manusia (*Homo sapiens*) dengan berat sekitar 1 g akan dihuni oleh beberapa ribu bakteri, atau sekitar 400 species (Hooper et al., 1998; Blaut, 1999). Dengan kenyataan bahwa di intestine organisme adalah habitat dari tak terhitung jumlahnya microflora, maka menjadi pertanyaan apakah manfaat yang diberikan dengan kehadiran microflora tersebut. Begitu juga pada saat bayi yang belum dilahirkan, pada saluran intestinenya adalah steril dari microflora, tapi ternyata setelah dilahirkan saluran intestinenya menjadi penuh dengan microflora berasal dari tubuh ibu dan lingkungan tempat kelahiran (Hikarioka, 1978). Dubos et al. (1965) meneliti microflora di intestine mouse (*Mus musculus*) dan rat (*Rattus norvegicus*), dan menyimpulkan bahwa microflora: (1). Mengikuti perubahan evolusi dari inang dan menjadi microflora utama yang disebut autochthonous microbiota, (2). Pada lingkungan tertentu menjadi microflora yang utama dan hadir secara normal atau normal microbiota, dan (3) Microflora yang secara kebetulan masuk dan berkoloni dan memiliki sifat pembawa penyakit (pathogen). Semua ketiga jenis microflora ini disebut indigenous bacteria. Sementara itu Savage (1977) mengelompokkan microflora yang hadir pada intestine inang ke dalam: (1) Microflora yang hadir di semua jenis hewan atau disebut autochthonous flora, dan (2) Microflora yang hadir untuk sementara waktu atau allochthonous flora. Kedua kelompok microflora ini disebut normal flora. Microflora yang tidak boleh tidak harus hadir pada inang, oleh van der Waaj (1989) menyebutkan salah satu fungsinya adalah untuk menghasilkan senyawa antibacterial dan produk lainnya untuk mencegah kolonisasi microflora penyebab penyakit untuk berkoloni di saluran intestine.

Selain berfungsi dalam mencegah bakteri penyebab penyakit untuk berkolonisasi di intestine, bakteri autochthonous juga berfungsi dalam memproduksi vitamin K, dan B12 bagi inang. Kehadiran autochthonous microflora adalah hal yang tak bisa dihilangkan dalam memberikan nutrisi tertentu bagi inang (Hooper et al., 1998).

Untuk berkoloni di dalam intestine, microflora harus menempel pada dinding dalam saluran intestine. Begitu juga yang terjadi untuk bakteri penyakit, penempelan pada dinding

intestine inang adalah hal pertama yang harus dilakukan (Hicks, 1996). Sudah cukup banyak mekanisme penempelan bakteri penyakit pada dinding intestine yang diketahui hingga saat ini. Untuk penempelan bakteri penyakit, seharusnya bakteri (1) bersifat motil (Freter et al., 1981), (2) Adanya colonization factors antigen I, II, dan memiliki fimbriae type1 (Knutton et al., 1984, 1985)), (3) memiliki Plasmid pMAR2 (Knutton et al., 1987), (4) Senyawa penempelan yang belum diketahui (Yamamoto et al., 1991), yang hanya disebut sebagai adhesin (Jann and Hoschutzky, 1990). Sedangkan microflora yang bukan bersifat sebagai penyakit yaitu autochthonous biota dan normal microbiota, hingga saat ini belum diketahui dengan jelas mekanisme penempelannya (Hooper et al., 1998).

Pada manusia dan hewan mamalia daratan lainnya, waktu dan tempat mempengaruhi keberadaan microflora yang menyusunnya. Perubahan microflora bisa terjadi secara besar-besaran (Hooper et al., 1998). Usia, jenis makanan, dan lingkungan hidup inang (misal tekanan udara) sangat mempengaruhi perubahan microflora yang ada di intestine (Savage, 1977). Hal yang sama juga dijelaskan oleh Hikarioka (1978) bahwa fisiologi, nutrisi, penyakit, dan stress adalah berhubungan dalam menyebabkan perubahan microflora pada intestine.

Sedangkan pada jenis ikan, keberadaan microflora, mirip dengan mamalia daratan, sangat berkaitan dalam beberapa hal, yang jika diperbandingkan bahwa studi tentang bakteri pada jenis ikan adalah masih sangat kurang, sehingga masih banyak hal-hal yang belum jelas. Misal, pada ikan belanak (*Mugil cephalus*) ataupun *Tachyurus arius*, belum dapat dijelaskan mengapa ada simbiosis bakteri bercahaya hidup pada organ tubuhnya (Hastings and Neilson, 1977; Ramesh and Venugopalan, 1988). Hingga saat ini, baru dapat disimpulkan bahwa pada jenis ikan susunan microfloranya adalah lebih sederhana dibanding pada hewan berdarah panas daratan. Microflora pada jenis ikan adalah umumnya bakteri aerobik dan bakteri facultative anaerobic (Uemura, 1977; Sugita, 2000). Sakata et al. (1980) telah menemukan 2 species bakteri obligate anaerobic pada 6 jenis ikan air tawar, yaitu species *Bacteroides* type A dan *Bacteroides* type B. Sedangkan Dyrset et al. (1984) pada intestine ikan capelin (*Mallotus villosus*) pun telah ditemukan group bakteri *Bacteroidaceae*.

Keterkaitan antara microflora dan inang ikan sebenarnya telah dimulai sejak ikan masih dalam tahap telur. Pada lingkungan perairan alami, media air tempat hidup ikan normalnya memiliki kepadatan bakteri antara $10^3 - 10^8$ CFU (colony forming unit)/mL (Scholes and

Shewan, 1964; Yoshimizu et al., 1980; Sugita et al., 1983; Boyd et al., 1984; Tanasomwang and Muroga, 1988; Nicolas et al., 1989; Pettibone, 1998). Penyebab utamanya adalah pada saat telur menetas, di permukaannya akan menempel bakteri yang berasal dari sedimen, air, dan tempat telur menempel, yang selanjutnya akan meningkat populasinya, dan bahkan menginfeksi telur yang berakibat embrio menjadi mati (Hansen and Olfasen, 1989). Bakteri yang menempel di permukaan luar telur berkisar 10^3 - 10^6 CFU/g (Yoshimizu et al., 1980; Sugita et al., 1988b). Pada ikan salmon ataupun ikan mas koki yang merupakan jenis ikan air tawar, pada telurnya terdapat mikroflora *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Cytophaga* dan *Flavobacterium* yang menjadi mikroflora utama yang terdapat di permukaan luar telur (Bell et al., 1971; Yoshimizu et al., 1980; Sugita et al., 1988b).

Hingga telur menetas, intestine ikan adalah steril dari bakteri, tetapi begitu telur menetas dan larva ikan mulai meminum air, maka mikroflora akan masuk ke saluran pencernaan bersamaan dengan kegiatan minum (Mangor-Jensen and Adolf, 1987; Tytler et al., 1990; Olfasen and Hansen, 1992). Selanjutnya, dari pakan, lingkungan, dan tingkatan pertumbuhan masing-masing memberikan pengaruh dalam komposisi mikroflora pada intestine ikan (Yoshimizu et al., 1980; Sugita et al., 1982; Campbell and Buswell, 1983; Muroga et al., 1987; Tanasomwang and Muroga, 1988; Nicolas et al., 1989; Cahill, 1990; Bergh et al., 1994). Peranan dari mikroflora di intestine ikan terus diteliti hingga saat ini.

Bakteri penyebab penyakit menyebabkan banyak kerusakan dalam perikanan. Utamanya bakteri Gram negative Family *Vibrio* (*Vibrionaceae*) dan *Enterobacteriaceae* (Trust, 1986; Moriarty, 1997). *Vibrio anguillarum* dan species lainnya menjadikan intestine sebagai pintu masuk yang utama seperti yang dilaporkan oleh Olsson et al (1996). Species bakteri patogen ini akan menempel pada dinding intestine (Horne and Baxendale, 1983; Chen and Hann, 1992), dan mengeluarkan protease untuk merusak dinding intestine (Gudmundsdottir, 1996; Sugita et al., 1998a). Bakteri penyebab penyakit ini bahkan pada ikan-ikan yang kelaparan, akan tetap hidup di intestine dalam waktu yang panjang (Husevag, 1995).

Untuk mencegah penyakit pada intestine yang disebabkan oleh kolonisasi bakteri penyakit, telah dilakukan upaya melakukan vaksin ataupun pemurnian darah secara ilmiah (Hart et al., 1988). Tetapi, pada manusia dan hewan ternak sekarang ini telah dilakukan usaha pemberian bakteri hidup atau probiotik untuk membuat keseimbangan mikroflora di dalam

intestine untuk menjaga kesehatan tubuh inang (Fox, 1988; Fuller, 1989). Begitu juga pada species ikan, belakangan ini telah dikembangkan microflora hidup probiotik yang bisa untuk mencegah perkembangan bakteri penyakit (Dopazo et al., 1988; Westerdahl et al., 1991; Olsson et al., 1992; Sugita et al., 1996b, 1996c, 1997b, 1998c). Akhir-akhir ini, microflora dari species *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, dan lainnya dari group bakteri asam laktat, telah digunakan sebagai probiotik untuk ikan cod (*Gadus morhua*), ikan sebelah (*Paralichthys olivaceus*) dan lainnya (Byun et al., 1997; Gildberg et al., 1997; Jobvorn et al., 1997; Kvasnikov et al., 1997; Ringo and Gatesoupe, 1998; Ringo et al., 2000; Robertson et al., 2000). Kemampuan probiotik tak hanya untuk mencegah penyakit, tetapi juga dapat digunakan dalam situasi yang lebih luas. Apabila bakteri hidup ini disebarkan di media hidup ikan, ini juga akan memberikan dampak perlindungan dalam mencegah penyakit yang disebut sebagai biokontrol (Gatesoupe, 1999; Maeda et al., 1997; Moriarty, 1997; Skjermo and Vadstein, 1999).

Pada ikan-ikan herbivore, omnivore dan carnivore, microflora yang hidup di intestine akan mencerna bahan makanan menjadi nutrisi yang lebih mudah untuk diserap inang, sehingga dapat dikatakan microflora yang hidup di intestine adalah berfungsi utama dalam membantu pencernaan inang (Rimmer and Wiebe, 1987; Smith et al., 1996; Sugita et al., 1998b). Amylase yang diproduksi oleh microflora intestine membantu dalam proses pencernaan amilum (Sugita et al., 1996a, 1997a). Chitin dan β -N-acetylglucosaminida dibantu pencernaannya oleh chitinase yang dihasilkan microflora intestine (Lindsay and Gooday, 1985; Sugita et al., 1999). Selain itu vitamin B12 dan biotin dari group vitamin B dihasilkan oleh microflora intestine untuk ikan inangnya (Sugita et al., 1991a, 1992). Selain nutrisi bermanfaat, produk toxin kuat tetrodotxin pada ikan buntal *Fugu vermicularis vermicularis* dan *Fugu niphobles* juga dihasilkan oleh microflora intestine (Noguchi et al., 1987; Sugita and Deguchi, 1988; Sugita et al., 1989c; Shiomi, 1994; Scoging, 1998).

Pada banyak penelitian yang telah dilakukan, sebagian besar berdasar pada kultur microflora pada media agar padat dan cair. Tetapi, metode kultur dalam pengidentifikasian microflora ini mendapat kesulitan dari biaya yang besar dan sangat tergantung pengalaman dari si peneliti. Selain itu, kultur murni dari microflora-pun pada dasarnya hanya sekitar 30% yang bisa teridentifikasi dengan tepat, lainnya adalah sulit untuk teridentifikasi. Tambahan lagi, pada tahun-tahun terakhir ini bakteri-bakteri yang bersifat ada tetapi tak bisa dikultur atau viable but-

nonculturable semakin banyak juga ditemukan di alam (Muyzer, 1998; O'Sullivan, 1999). Sugita et al (1981b) telah menemukan kecenderungan terjadi perbedaan besar dalam jumlah dan jenis dari mikroflora intestine dari hasil metode kultur dengan metode perhitungan langsung pada mikroflora intestine ikan mas (*Cyprinus carpio*), ikan mas koki (*Carassius auratus*), dan nila (*Oreochromis niloticus*). Dengan adanya banyak masalah dalam analisis mikroflora intestine ikan, sehingga akhir-akhir ini digunakan analisis ekologi molekuler untuk mengatasi kelemahan metode kultur mikroflora. Beberapa metode analisis selain metode kultur telah dipublikasikan (O'Sullivan, 1999). Dari beberapa metode itu, salah satunya yaitu metode FISH atau Fluorescence in situ hybridization method) telah dilakukan uji coba untuk mengetahui ada tidaknya kemampuannya dalam menganalisis mikroflora intestine ikan. Dengan demikian, penelitian untuk disertasi ini berlangsung seperti di bawah ini:

BAB 2 adalah melakukan analisis jenis dan kelimpahana mikroflora intestine ikan pantai maaji *Trachurus japonicus*, hiiragi *Leiognathus nuchalis* dan akakamasu *Sphyrna pinguis*, serta ikan air tawar iakan mas koki secara metode kultur. Ditemukan bahwa Genus *Vibrio* adalah genus dominan, dan bakteri anaerobic obligate ditemukan dalam jumlah sedikit. Sedangkan pada ikan mas koki, bakteri aerobic *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrio*, dan bakteri anaerobic obligat *Bacteroidaceae* adalah yang mendominasi. Hasil uji vilogenetik menunjukkan mikroflorateridentifikasi terkelompok kedalam 8 group, yang di dalamnya terdapat 2 species bakteri anaerobic obligate. Sedangkana pada ikan air tawar, bakteri aerobic dan bakteri anaerobic adalah yang utama.

Pada **BAB 3**, rDNA yang terdapat pada tiap kelompok mikroflora dianalisis dengan menggunakan probe berfluorescent pada rantai khusus DNA pencari species atau group (metode FISH). Studi ini dilakukan untuk mengetahui apakah metode ini cukup kuat untuk menganalisis mikroflora pada intestine ikan. Hasilnya menunjukkan bahwa mikroflora yang semula tidak banyak ditemukan jumlahnya, ternyata dengan metode FISH berhasil ditemukan lebih tinggi. Dengan demikian, metode FISH bisa digunakan untuk menganalisis mikroflorapada intestine ikan.

BAB 4 dilakukan analisis mikroflora pada kotoran atau feces ikan mas koki, dan ditemukan bahwa *Archaea*, *Aeromonas*, dan *Acinetobacter* adalah mikroflora utama. Selain itu

diketahui pula bahwa jumlah dan jenis mikroflora berfluktuasi kuat dari hari ke hari, dan dari individu ke individu.

BAB 5 adalah studi mengenai perbedaan kualitas dan kuantitas mikroflora berdasarkan bagian dari intestine ikan mas koki, mas, dan nila (*Oreochromis mossambicus*). Semua species ikan ini memiliki kecenderungan bahwa bagian depan, tengah, dan khir saluran intestine memiliki jumlah dan jenis mikroflora yang berbeda, dimana semakin meningkat ke arah bagian akhir dari intestine. Hal ini memperlihatkan, isi dari intestine yang terus bergerak ke bagian anus dapat menyebabkan populasi dan jenis mikroflora juga akan semakin meningkat.

BAB 6 adalah merupakan pembahasan utama dari masing-masing bab.