

## PATHOGENICITY AND *IN VIVO* STUDY OF LOCAL ISOLATE *Bacillus* sp. D2.2 AT THE VANNAMEI CULTURE (*Litopenaeus vannamei*)

Sera Hardiyani<sup>1</sup> · Esti Harpeni<sup>2</sup> · Agus Setyawan<sup>2</sup> · Supono<sup>2</sup>

**Ringkasan** Penggunaan bakteri biokontrol dapat dijadikan solusi bagi permasalahan pemberantasan penyakit untuk menekan pertumbuhan bakteri patogen pada budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Bacillus* sp. D2.2 merupakan isolat bakteri lokal yang terbukti mampu menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi* secara *in vitro*. Potensi lain isolat bakteri ini perlu diketahui lebih lanjut melalui penelitian ini. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat patogenisitas bakteri biokontrol *Bacillus* sp. D2.2 terhadap udang vaname dan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio alginolyticus* secara *in vivo*. Uji patogenisitas *Bacillus* sp. D2.2 dilakukan dengan metode LD<sub>50</sub> pada tingkat kepadatan 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> dan 10<sup>6</sup> CFU/ml. Hasil LD<sub>50</sub> menunjukkan *Bacillus* sp. D2.2 tidak bersifat patogen karena tidak ada konsentrasi bakteri yang mematikan hingga 50% larva udang vaname. Uji antagonisme *Bacillus* sp. D2.2 terhadap *V.alginolyticus* secara *in vivo* dilakukan pada 2 perlakuan, yaitu pemeliharaan udang vaname tanpa penambahan *Bacillus* sp. D2.2 dan pemeliharaan udang vaname dengan penambahan *Bacillus* sp. D2.2. Kedua perlakuan diuji tantang dengan *V.alginolyticus* 10<sup>5</sup> cfu/ml dan diulang 3 kali. Hasil peneli-

tian menunjukkan *Bacillus* sp. D2.2 mampu menurunkan pertumbuhan *V.alginolyticus* dari 10<sup>5</sup>CFU/ml sampai 10<sup>3</sup> CFU/ml. Hal tersebut menjelaskan bahwa *Bacillus* sp. D2.2 berpotensi sebagai bakteri biokontrol.

**Keywords** *biokontrol, Bacillus* sp. D2.2, *Litopenaeus vannamei, Vibrio alginolyticus*

Received : 09 September 2016

Accepted : 21 Oktober 2016

### PENDAHULUAN

Udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang merupakan udang introduksi dari pantai Pasifik di Amerika Latin (Briggs et al., 2004), masuk ke Indonesia pada awal tahun 2000 (Sugama et al., 2006). Udang ini memiliki beberapa keunggulan dibanding spesies udang peneid lainnya, diantaranya, pertumbuhan yang cepat, produktivitas tinggi, dan lebih resisten terhadap penyakit (Briggs et al., 2004). Namun tidak dapat dipungkiri bahwa seiring perkembangannya, udang vaname juga mulai terserang penyakit. Penyakit yang sering menyerang udang vaname adalah vibriosis atau penyakit udang berpendar, karena bakteri *Vibrio* sp. yang merupakan penyebab penyakit vibriosis akan mengeluarkan senyawa luminescence yang terlihat seperti cahaya pada malam hari. Jenis bakteri seperti *V.harveyi, V.alginolyticus* dan *V.parahaemolyticus* merupakan jenis bakteri yang paling sering menyebabkan penya-

<sup>1</sup>)Alumni Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung

<sup>2</sup>)Dosen Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Alamat: Jalan Prof. Soemantri Brodjonegoro No. 1 Bandar Lampung 35145.

E-mail: edypeni@yahoo.com

kit vibriosis pada udang (Esteve and Herrera, 2000; Fan et al. 2006; Phuoc et al. 2008; Soto-Rodriguez et al. 2010).

Penelitian akuakultur yang membahas tentang antagonisme *Bacillus* sp. terhadap bakteri *Vibrio* telah banyak dilakukan (Vaseeharan and Ramasamy 2003; Domrongpookaphan and Wanchaitanawong 2006; Balcázar and Rojas-Luna 2007). Kehadiran bakteri agen biokontrol dapat dijadikan solusi bagi permasalahan pemberantasan penyakit untuk menekan pertumbuhan bakteri, bahkan Verschuere et al. (2000) dan Janarthanam et al. (2012) menambahkan tentang pentingnya menggunakan bakteri lokal (indigenous) sebagai biokontrol terhadap bakteri patogen karena lebih cepat beradaptasi serta mampu menjaga kualitas air dan kesehatan kultivan. patogen. Penelitian sebelumnya menemukan satu isolat bakteri biokontrol dengan *Bacillus* sp. D2.2 dari tambak tradisional di Desa Mulyosari, Kecamatan Pasir Sakti, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* secara in vitro (Setyawan et al. 2014). Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan untuk mengetahui tingkat patogenisitas bakteri biokontrol *Bacillus* sp. D2.2 terhadap udang vaname dan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio* sp. secara in vivo.

## MATERI DAN METODE

### Uji Patogenisitas

Uji patogenisitas dilakukan melalui uji LD<sub>50</sub> (*Lethal Dosage 50*) untuk mengetahui pada dosis berapa isolat bakteri *Bacillus* sp. D2.2 bersifat patogen terhadap larva udang vaname. Nilai LD<sub>50</sub> yang didapatkan akan digunakan untuk menentukan dosis bakteri biokontrol pada ujiantang saat bakteri *V.alginolyticus* dimasukkan ke media pemeliharaan. Isolat bakteri biokontrol dikultur pada media TSB kemudian diinkubasi di orbital shaker selama 24 jam pada suhu ruang sekitar 27°C. Isolat bakteri disediakan dalam tingkatan kepadatan 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> dan 10<sup>6</sup> CFU/ml. Udang uji yang digunakan untuk tiap perlakuan berjumlah sepuluh

ekor tiap akuarium dengan tiga ulangan. Uji patogenisitas dilakukan dengan memasukkan bakteri *Bacillus* sp. D2.2 ke media pemeliharaan larva udang untuk menciptakan kondisi infeksi secara alami. Udang uji dipelihara dalam akuarium selama 14 hari dengan mengamati sintasan dan gejala klinis yang timbul.

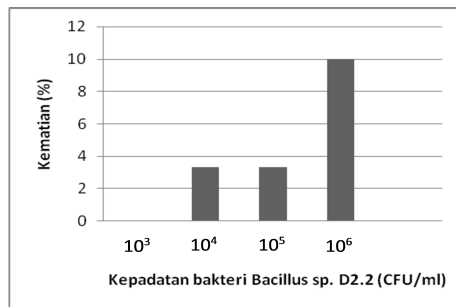
Uji Antagonisme Bakteri *Bacillus* sp. D2.2 secara in vivo pada Udang Vaname terhadap Bakteri Patogen *Vibrio alginolyticus*.

Setelah mendapatkan nilai LD<sub>50</sub>, dosis bakteri *Bacillus* sp. D2.2 yang akan digunakan untuk ujiantang terhadap bakteri patogen *V. alginolyticus* dapat ditentukan. *V. alginolyticus*, dimasukkan ke dalam media pemeliharaan udang. Kepadatan bakteri *V.alginolyticus* yang digunakan pada ujiantang sama dengan bakteri biokontrol. Uji in vivo dilakukan dengan 2 perlakuan, yaitu pemeliharaan udang vaname tanpa penambahan *Bacillus* sp. D2.2 (P1) dan pemeliharaan udang vaname dengan penambahan *Bacillus* sp. D2.2 (P2). Kedua perlakuan tersebut diujiantang dengan *V. alginolyticus*. Pengamatan dilakukan selama 3-7 hari dengan parameter pengamatan sintasan hidup udang vaname dan TVC (*Total Vibrio Count*). Data dianalisis dengan menggunakan uji statistik nilai tengah (uji t) pada selang kepercayaan 95%.

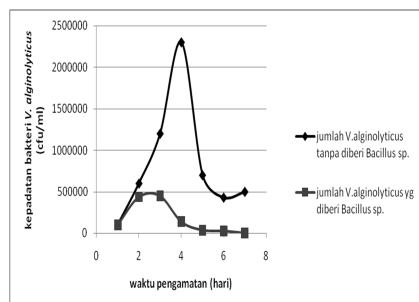
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji LD<sub>50</sub> menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus* sp. D2.2 tidak bersifat patogen karena dari semua kepadatan bakteri *Bacillus* sp. yang digunakan tidak ada yang mematikan hingga 50% hewan uji selama 15 hari masa pemeliharaan. Pada kepadatan *Bacillus* sp. D2.2 10<sup>3</sup> cfu/ml, tidak ada larva udang yang mati, pada kepadatan bakteri 10<sup>4</sup> dan 10<sup>5</sup> cfu/ml terjadi kematian larva udang sebesar 3%, dan kepadatan bakteri 10<sup>6</sup> cfu/ml menghasilkan tingkat kematian larva udang tertinggi sebesar 10% (Gambar 1).

*Bacillus* sp. juga telah teruji tidak bersifat patogen bagi ikan-ikan air tawar (Lusiastuti and



**Gambar 1** Tingkat kematian udang saat uji patogenisitas



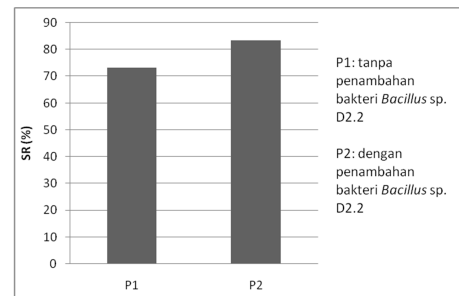
**Gambar 2** Kepadatan bakteri *V. alginolyticus* pada uji in vivo

Taukhid, 2011). Penggunaan suatu bakteri sebagai agen biokontrol harus dapat memberikan keuntungan dan tidak merugikan pada inang (Nour and El-Ghiet 2011).

Kepadatan bakteri biokontrol *Bacillus* sp. D2.2 yang dipilih untuk digunakan pada uji in vivo terhadap bakteri patogen *V. alginolyticus* adalah  $10^5$  cfu/ml yang dinilai lebih aman dibandingkan kepadatan bakteri  $10^6$  cfu/ml karena tingkat kematian yang lebih kecil. *V. alginolyticus* yang digunakan juga disediakan pada kepadatan  $10^5$  cfu/ml.

Jumlah kepadatan bakteri *V. alginolyticus* tanpa pemberian *Bacillus* sp. D2.2 terjadi peningkatan sejak hari pertama hingga hari ketiga mencapai puncak kepadatan tertinggi sebesar  $2,3 \times 10^6$  cfu/ml kemudian menurun menjadi  $5 \times 10^5$  cfu/ml di akhir pengamatan (Gambar 2). Sedangkan pada P2, jumlah kepadatan bakteri *V. alginolyticus* terus mengalami penurunan selama waktu pengamatan hingga di akhir waktu pengamatan jumlah kepadatan bakteri menjadi  $4,7 \times 10^3$  cfu/ml.

Hasil analisis uji t menunjukkan penambahan bakteri biokontrol *Bacillus* sp. D2.2 berpengaruh terhadap jumlah kepadatan bakteri *V. al-*



**Gambar 3** Survival rate (SR) udang vaname pada uji in vivo

*ginolyticus* pada pengamatan hari kedua dan ketiga, namun tidak berpengaruh pada pengamatan hari keempat, kelima dan keenam.

Kemampuan bakteri *Bacillus* sp. dalam menghambat pertumbuhan patogen dikarenakan sifat antagonisme bakteri tersebut, berupa persaingan nutrisi dan senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus* sp. yang dapat merugikan bakteri lain. Sedikitnya ada 66 jenis antibiotik yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus* sp. (Nishijima et al., 2005). Sifat antagonisme bakteri *Bacillus* sp. D2.2 yaitu menghasilkan senyawa antibakteri berupa antibakteri polipeptida yaitu bacitracin, yang mampu menghambat sintesis peptidoglikan dinding sel, merusak permeabilitas membran sel dan merubah sistem respirasi (Setyawan et al., 2014).

Penambahan bakteri biokontrol *Bacillus* sp. D2.2 pada uji in vivo terhadap kelangsungan hidup udang vaname tidak berbeda nyata dengan perlakuan tanpa penambahan bakteri biokontrol ( $p < 0,05$ ). Gambar 3. menunjukkan kelangsungan hidup udang vaname yang diberi bakteri *Bacillus* sp. D2.2 dan *V. alginolyticus* (P2) lebih besar 10% dibandingkan udang vaname yang diberikan *V. alginolyticus* tanpa penambahan bakteri *Bacillus* sp. D2.2 (P1). Hal tersebut dikarenakan adanya bakteri biokontrol *Bacillus* sp. D2.2 yang dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen *V. alginolyticus* sehingga meminimalkan bakteri *V. alginolyticus* menyerang tubuh larva udang vaname.

Kehadiran bakteri *Bacillus* sp. dalam dunia perikanan telah banyak membantu para pembudidaya dalam mencegah dan mengatasi permasalahan budidaya akibat serangan bakteri patogen. Hasil penelitian Karunasagar et al. (2005) menyatakan 27 strain *Bacillus* spp. positif meng-

hambat pertumbuhan 4 strain *Vibrio* sp. secara in vitro. Janarthanam et al. (2012) mengisolasi bakteri *Bacillus* spp. di perairan India dan menguji keefektifannya dalam menghambat bakteri patogen *V. harveyi* secara in vitro maupun in vivo, dan menyatakan bahwa isolat bakteri *Bacillus* spp. mampu meningkatkan kelangsungan hidup udang windu dan mampu mengontrol virulensi dari *V. harveyi*. Selain menghambat pertumbuhan bakteri patogen, manfaat pokok yang ditimbulkan bakteri *Bacillus* sp. adalah meningkatkan kelangsungan hidup hewan uji.

## SIMPULAN

Bakteri biokontrol *Bacillus* sp. D2.2 tidak bersifat patogen pada kepadatan  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  CFU/ml. Penambahan bakteri biokontrol *Bacillus* sp. D2.2 mampu menurunkan pertumbuhan bakteri patogen *V. alginolyticus* secara in vivo.

## Pustaka

- Balcázar, J. L. and Rojas-Luna, T. (2007). Inhibitory activity of probiotic bacillus subtilis utm 126 against vibrio species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (litopenaeus vannamei). *Current microbiology*, 55(5):409–412.
- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R., and Phillips, M. (2004). Introductions and movement of penaeus vannamei and penaeus stylirostris in asia and the pacific. *RAP publication*, 10:92.
- Domrongpookkaphan, V. and Wanchaitanawong, P. (2006). In vitro antimicrobial activity of bacillus spp. against pathogenic vibrio spp. in black tiger shrimp (penaeus monodon). *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 40:949–957.
- Esteve, M. and Herrera, F. C. (2000). Hepatopancreatic alterations in litopenaeus vannamei (boone, 1939)(crustacea: Decapoda: Penaeidae) experimentally infected with a vibrio alginolyticus strain. *Journal of invertebrate pathology*, 76(1):1–5.
- Fan, J.-F., Li, W.-Z., Zang, H.-M., Wang, B., and Song, L.-C. (2006). The pathogen of red body disease in litopenaeus vannamei. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 30(6):742–746.
- Janarthanam, K., George, M. R., John, K. R., and Jeyaseelan, M. (2012). In vitro and in vivo biocontrol of vibrio harveyi using indigenous bacterium, bacillus spp.
- Karunasagar, I., Karunasagar, I., and Umeha, R. (2005). 13. microbial diseases in shrimp aquaculture.
- Lusiastuti, A. M. and Tauhid (2011). Seleksi kandidat probiotik anti aeromonas hydrophila untuk pengendalian penyakit ikan air tawar. Technical Report 2, Balai Riset Penelitian Budidaya Air Tawar.
- Nishijima, T., Toyota, K., and Mochizuki, M. (2005). Predominant culturable bacillus species in japanese arable soils and their potential as biocontrol agents. *Microbes and environments*, 20(1):61–68.
- Nour, E. and El-Ghiet, E. A. (2011). Efficacy of pseudomonas fluorescens as biological control agent against aeromonas hydrophila infection in oreo chromis niloticus. *World J Fish Marine Sci*, 3(6):564–569.
- Phuoc, L., Corteel, M., Nauwynck, H., Pensert, M., Alday-Sanz, V., Van Den Broeck, W., Sorgeloos, P., and Bossier, P. (2008). Increased susceptibility of white spot syndrome virus-infected litopenaeus vannamei to vibrio campbellii. *Environmental microbiology*, 10(10):2718–2727.
- Setyawan, A., Harpeni, E., Ali, M., Mariska, D., and Aji, M. (2014). Potensi agen bakteri biokontrol indigenous tambak tradisional udang windu (penaeus monodon) di lampung timur strain d.2.2, terhadap bakteri patogen pada udang dan ikan. Potensi agen bakteri biokontrol indigenous tambak tradisional udang windu (penaeus monodon) di lampung timur strain d.2.2, terhadap bakteri patogen pada udang dan ikan. *Pertemuan Ahli Kesehatan Ikan*.
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., and Lozano, R. (2010). Bright-red syndrome in pacific white shrimp litopenaeus vannamei is caused by vibrio harveyi. *Diseases of aquatic organisms*, 92(1):11–19.

- Sugama, K., Novita, H., and Koesharyani, I. (2006). Production performance; diseases; spf-breeding; and risk issues concerning white shrimp, *penaeus vannamei* introduction into indonesia. *Indonesian Aquaculture Journal*, 1(1):71–77.
- Vaseeharan, B. and Ramasamy, P. (2003). Control of pathogenic vibrio spp. by bacillus subtilis bt23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *penaeus monodon*. *Letters in applied microbiology*, 36(2):83–87.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4):655–671.