

ANALYSIS OF BACTERIAL ABUNDANCE IN THE INTESTINES OF COMMON CARP *Cyprinus carpio* TREATED WITH THE PROBIOTIC *Bacillus subtilis*

**Alin Shelina Nurashila¹ · Yuniar Mulyani¹ · Zuzy Anna¹ ·
Mochamad Untung Kurnia Agung¹**

ABSTRACT Efforts to increase microbial populations in fish intestines tract can be done by utilizing microbes in the fish's digestive tract as probiotics. The application of *Bacillus subtilis* in fish feed mixtures can provide better growth performance in modifying microbes in the intestines of fish. Aim of this research was to analyze the bacterial community in the intestines of Common Carp (*Cyprinus carpio*) that have been given probiotics from bacteria *Bacillus subtilis* with metagenome sequencing using 16S rRNA through Next Generation Sequencing (NGS) technology.

Common carp samples were collected from maintenance conducted with different treatments, namely control fish without probiotic administration and fish treatment with mixed feed probiotic *Bacillus subtilis*. This research was conducted in Laboratory of Fisheries Biotechnology, Faculty of Fisheries and Marine Science, Padjadjaran University. Then molecular identification was carried out using Illumina's NGS in Novogene, Singapore. The results of the identification of using probiotic bacteria *Bacillus subtilis* in Common carp (*Cyprinus carpio*) feed affect the bacterial community in the fish

¹ Program Studi Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang KM.21,
Jatinangor.
E-mail: watisulis379@gmail.com

intestine. In the intestines of carp that were given probiotics, the highest abundance was *Proteobacteria*, *Fusobacteriota* and *firmicutes*. The highest abundance at the genus level in both samples was domiciled by the genus *Cetobacterium* followed by the *Sphingomonas* and *Aeromonas*.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Cyprinus carpio*, Next Generation Sequencing, Abundance

PENDAHULUAN

Budidaya Ikan mas (*Cyprinus carpio*) cukup berkembang di Indonesia sebagai ikan konsumsi air tawar yang memiliki nilai ekonomis yang tinggi dan berpotensi untuk dikembangkan lebih luas di Indonesia. Berdasarkan data dari Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya tahun 2019, terjadi peningkatan produksi ikan mas dari tahun 2015 hingga tahun 2019. Namun target produksi ikan mas masih belum tercapai. Kendala yang sering terjadi dalam kegiatan budidaya sering mengalami kegagalan produksi baik secara kualitas maupun kuantitas. Budidaya ikan mas pada umumnya tidak terlepas dari resiko biologis terutama yang disebabkan oleh adanya gangguan penyakit (Purwaningsih, 2013).

Komposisi mikrobiota saluran pencernaan dapat berperan dalam pengaturan proses biologis dan fisiologis tubuh dan bergantung pada populasi bakteri yang ada di saluran pencernaan. Beberapa jenis bakteri yang termakan dan masuk ke dalam saluran pencernaan ini berperan dalam menyumbangkan enzim pencernaan eksogen untuk meningkatkan kecernaan nutrisi pakan yang telah dikonsumsi

oleh ikan sehingga dapat mendukung keberhasilan dalam aktivitas budidaya (Aslamyiah et al., 2009).

Menurut Fuller (1989) probiotik adalah produk yang tersusun oleh biakan mikroba atau pakan alami mikroskopik yang bersifat menguntungkan dan memberikan dampak bagi peningkatan keseimbangan mikroba saluran usus hewan inang. Salah satu syarat atau karakteristik yang harus dipertimbangkan untuk menentukan apakah suatu mikroba berpotensi untuk menjadi kultur probiotik yaitu ketahanan terhadap asam, sebab untuk dapat bertahan dan tumbuh dalam saluran pencernaan kultur bakteri harus melewati beberapa rintangan seperti keasaman lambung yang tinggi yang dapat berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri probiotik. Di samping itu bakteri probiotik harus mampu bersaing dengan bakteri enterik patogen dalam saluran pencernaan (Susanti et al., 2007). Salah satu kandidat bakteri yang dapat dijadikan probiotik adalah *Bacillus subtilis* (Rahmawan et al., 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Ray et al. (2007) dan Mulyani et al. (2018) berhasil mengisolasi *Bacillus subtilis* dari usus ikan dan sudah mengujinya sebagai bakteri yang potensial untuk memproduksi enzim selulase serta sebagai imunostimulan yang dapat meningkatkan sistem imun. Pemberian bakteri *Bacillus subtilis* dalam campuran pakan dapat memberikan kinerja pertumbuhan yang lebih baik dan memodifikasi mikrobiota usus serta mengurangi bakteri patogen (Tachibana et al., 2021).

Keanekaragaman mikrobiota usus pada ikan mas dapat dianalisis dengan sekuensing metagenomik 16S rRNA

melalui teknologi *Next Generation Sequencing* (NGS). Metode NGS mampu menghasilkan data yang lebih banyak dengan waktu yang lebih singkat (Metzker, 2010). Berdasarkan hal-hal di atas, penelitian ini dibuat untuk menganalisis pengaruh pemberian probiotik dari bakteri *Bacillus subtilis* terhadap struktur komunitas bakteri pada usus ikan mas dalam upaya meningkatkan daya tahan tubuh ikan mas dan budidaya di Indonesia dengan menggunakan teknologi *Next Generation Sequencing*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus hingga Desember 2021. Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) diperoleh dari pemeliharaan yang dilakukan di Laboratorium Akuakultur Gedung 4 Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Unpad yang diberi pakan dengan perlakuan yang berbeda yaitu ikan kontrol tanpa pemberian probiotik dan ikan treatment dengan pemberian pakan campuran probiotik bakteri *Bacillus subtilis* yang diambil dari koleksi Laboratorium Bioteknologi Perikanan dan Ilmu Kelautan Unpad. Selanjutnya sampel usus ikan yang diambil dari dua perlakuan tersebut diisolasi untuk proses sekuensing dengan NGS (*Next Generation Sequencing*) yang dilakukan di Novogene, Singapura.

Penelitian ini menggunakan metode eksploratif dan data yang diperoleh selanjutnya dianalisis secara deskriptif. Data yang dianalisis secara deskriptif adalah data QC (*Quality Control*),

pengukuran kemurniaan dan konsentrasi DNA, dan struktur komunitas bakteri pada usus ikan mas yang diperoleh dari hasil pengolahan data sekuensing.

Isi usus ikan pada kedua sampel yang telah diambil dilanjutkan dengan isolasi DNA metagenom untuk dapat mengisolasi bakteri yang ada pada usus ikan yang telah dipelihara dengan perlakuan yang berbeda. DNA metagenom dari bakteri usus ikan diisolasi dan diekstraksi berdasarkan prosedur pada *Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit* (Zymo Research, catalog no. D6010). Hasil isolasi di visualisasi dengan elektroforesis dan dilakukan pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dengan menggunakan spektrofotometer. Sampel DNA yang telah diuji hasilnya dengan elektroforesis dan spektrofotometer dikirim ke Novogene, Singapura, untuk dilakukan sekuensing. Penelitian ini menggunakan metode *Next Generation Sequencing* (NGS) Illumina PE250.

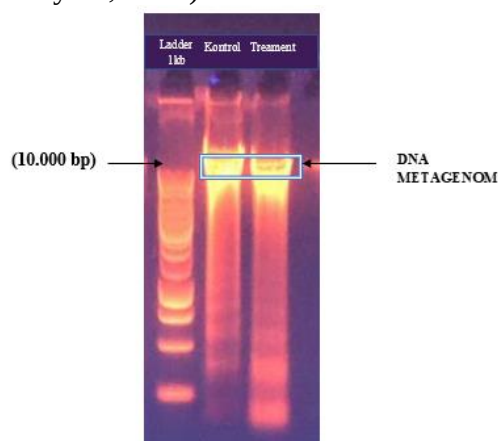
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kebiasaan makanan ikan diprediksi dari perbandingan panjang saluran pencernaannya dengan panjang total tubuhnya. Hasil pengukuran pada Tabel 1 didapatkan bahwa rasio panjang usus kedua sampel ikan mas adalah 1,29 dan 1,28 dari panjang tubuhnya sehingga tergolong sebagai ikan omnivora. Menurut pernyataan Syahputra *et al.*, (2014) bahwa indeks panjang usus relatif untuk ikan karnivora adalah 1, ikan omnivora 1-3, ikan herbivora >3.

Tabel 1 Data Panjang serta Bobot Tubuh dan Usus Ikan Mas

No.	Sampel	Panjang Tubuh (cm)	Bobot Ikan (gram)	Panjang Usus (cm)	Bobot Usus (cm)	Stadia	Rasio Panjang usus/ panjang tubuh total
1.	Kontrol	9,5	12,51	12,3	0,5489	Benih	1,29
2.	Treatment	9,7	12,95	12,5	0,8569	Benih	1,28

Sampel yang diperoleh kemudian diisolasi berdasarkan prosedur, menggunakan *Quick-DNATM Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit* (Zymo Research). Dalam memperoleh konsentrasi dan kemurnian DNA parameter yang digunakan adalah nilai kemurnian dan kualitas DNA. Konsentrasi DNA dan kemurniannya diukur dengan metode spektrofotometer, sedangkan untuk visualisasi DNA hasil isolasi menggunakan metode elektroforesis (Mulyani, 2011).

**Gambar 1** Hasil Isolasi DNA Metagenom

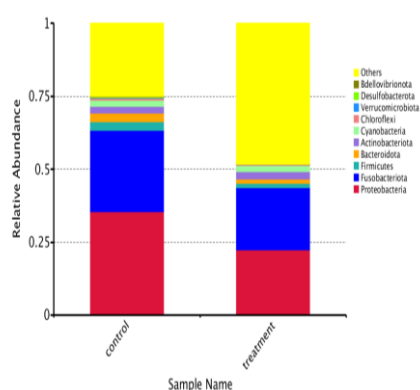
Hasil isolasi DNA dengan menggunakan elektroforesis (Gambar 1) menunjukkan adanya pita-pita DNA yang diisolasi dari sampel ikan mas kontrol dan treatment. Terlihat ketebalan pita beragam, hal ini disebabkan oleh konsentrasi DNA yang berbeda pada setiap sampel. Hasil Kemurnian DNA dari hasil elektroforesis dikonfirmasi melalui uji kuantitatif menggunakan pengukuran dengan spektrofotometer (Tabel 2).

Nilai kemurnian DNA pada kedua sampel yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah 1.91 yang berarti dapat dikatakan bahwa kedua sampel ini murni. Menurut Sambrook *et al.* (2001) hasil isolasi DNA dikatakan murni jika nilai rasio $A_{260/280}$ antara 1,8-2,0. Pada penelitian ini nilai konsentrasi DNA yang diperoleh adalah 295,8 ng/μl dan 87,1 ng/μl (Tabel 2). Konsentrasi tersebut sudah memenuhi kebutuhan dalam sekuensing DNA dengan *Next Generation Sequencing* 16S rRNA di Novogene, Siangapura. yaitu genom ≥ 10 ng/μl (Novogene, 2021). Metode yang digunakan dalam sekuensing ini adalah metode *Next Generation Sequencing* Illumina Hiseq 16S rRNA. Banyak sedikitnya DNA yang dihasilkan dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya menurut Mulyani *et al.* (2011) mengatakan konsentrasi DNA genom yang rendah dapat diakibatkan karena pada proses ekstraksi tidak dilakukan penambahan *buffer* lisis.

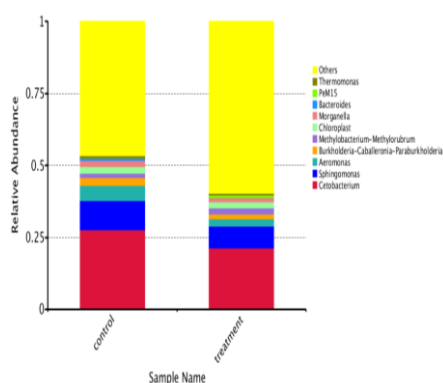
Hasil dari analisis sekuensing menggunakan *Next Generation Sequencing* (NGS) mengenai kelimpahan dan struktur komunitas bakteri usus ikan mas dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.

Kelimpahan relatif Komunitas bakteri tertinggi pada kedua sampel ikan yang teridentifikasi dalam tingkat filum (Gambar 2) adalah Proteobacteria dengan kelimpahannya 35% pada sampel kontrol dan 22% pada sampel treatment. Selanjutnya diikuti dengan

kelimpahan relatif Fusobacteriota, firmicutes, Bacteroidota, Actinobacteriota Cyanobacteria, Chlorefexi, Verrucomicrobiota, Desulfobacterota dan Bdellovibrionota. Fusobacteria, Proteobacteria dan Firmicutes adalah komponen filum bakteri utama pada saluran pencernaan ikan yang paling banyak ditemukan pada saluran pencernaan (Sullam *et al.* 2012; Larsen *et al.* 2014).



Gambar 2 Filum Bakteri (TOP 10) pada kedua sampel



Gambar 3 Genus Bakteri (TOP 10) pada kedua sampel

Berdasarkan Gambar 3, kelimpahan tertinggi pada tingkat genus pada kedua sampel didominasi oleh genus *Cetobacterium* dan *Sphingomonas*. Kemudian diikuti oleh genus *Aeromonas*, *Burkholderia-Caballeronia* - *Paraburkholderia*,

Methylobacterium - *Methylorubrum*, *Chloroplast*, *Morganella*, *Bacteroides*, *PeM15* (*Acnobia*), dan *Thermomonas*.

Kelimpahan relatif tingkat genus didominasi *Cetobacterium* pada kedua sampel dengan kelimpahannya sebanyak 28% pada sampel kontrol dan pada sampel treatment sebanyak 21%. Genus *Cetobacterium* diantaranya adalah spesies *Cetobacterium somerae* banyak ditemukan pada ikan air tawar, mempunyai kemampuan menghasilkan vitamin B12 yang tinggi. Vitamin B12 bermanfaat dalam pembentukan protein, sel darah, dan jaringan (Sugita *et al.*, 1990). Keberadaan dan kelimpahannya yang tinggi pada ikan air tawar memiliki potensi dalam pengembangan probiotik dan prebiotik di masa datang (Larsen *et al.*, 2014).

Kelimpahan relatif tertinggi lainnya adalah *Sphingomonas* strain tertentu dari spesies *Sphingomonas* mampu mendegradasi berbagai senyawa aromatik di lingkungan perairan yang terkontaminasi *mycrocystins* (MCs) yang dihasilkan oleh *Cyanobacteria* (Leys, 2004).

Bakteri dari genus *Aeromonas* juga terdapat pada kedua sampel. *Aeromonas* merupakan mikroorganisme akuatik yang berada di perairan laut dan tawar yang dapat menyebabkan berbagai penyakit pada ikan tawar (Yogananth *et al.*, 2010). Pada sampel kontrol yang tidak diberi penambahan *Bacillus subtilis* kelimpahannya lebih tinggi dibandingkan dengan sampel treatment yang diberi penambahan probiotik *Bacillus subtilis*. Hal ini dikarenakan bakteri yang terdapat pada probiotik mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen (Moriarty, 1998).

Tabel 2 Nilai Kemurnian dan Konsentrasi DNA Metagenom

No.	Sampel	A260	A280	Kemurnian (Rasio A260/A280)	Konsentrasi (ng/μl)
1.	Kontrol	0,2958	0,1549	1,91	295,8
2.	Treatment	0,0871	0,0456	1,91	87,1

KESIMPULAN

Pemberian probiotik bakteri *Bacillus subtilis* pada pakan ikan mas (*Cyprinus carpio*) memberikan pengaruh terhadap komunitas bakteri pada usus ikan mas. Pada usus ikan mas yang diberikan probiotik memiliki kelimpahan tertinggi pada filum Proteobacteria dengan kelimpahan lebih besar yaitu 35% pada sampel kontrol dan 22% pada sampel treatment. Selanjutnya diikuti dengan kelimpahan relatif Fusobacteriota dan firmicutes.

Kelimpahan tertinggi pada tingkat genus pada kedua sampel didominasi oleh genus *Cetobacterium* dengan kelimpahannya sebanyak 28% pada sampel kontrol dan pada sampel treatment sebanyak 21%. kemudian diikuti oleh genus *Sphingomonas* dan *Aeromonas*.

PUSTAKA

Aslamyiah, S., Azis, H.Y., Sriwulan, dan Wiryawan, K.G. 2009. Mikroflora saluran pencernaan ikan gurame (*Osphronemus gouramy Lacepede*). *Torani-Jurnal Ilmu Kelautan dan Perikanan*, 19(1): 66 – 73.

Fuller, R. 1989. A Review: Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.

Joseph, S.W., A.M. Carnahan, P.R. Bryton, G.R. Fanning, R. Almazan, C. Drabick, E.W. Trudo dan R.R.Colwell. 1991. *Aeromonas*

jandaei and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. *J. Clin. Microbiol.* 29: 565-9.

Leys, N.M.E., Ryngaert, A., L. Bastiaens, Verstraete, W., E.M. Top, dan D. Springael. 2004. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 11944e11955.

Larsen, A.M., Mohammed, H. H., Arias, C.R. 2014. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. *Journal of Applied Microbiology*. 116: 1396-1404.

Metzker, M. L. 2010. Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31–46. doi: 10.1038/nrg2626.

Mulyani, Y.,I. Aryantha, N.P., Suhandono, S., dan Pancoro, A. 2018. Intestinal bacteria of common carp (*Cyprinus carpio* L.) as a biological control agent for aeromonas. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(2), 601–610. Doi: 10.22207/JPAM.12.2.18

Mulyani, Y., A. Purwanto, dan Nurruhwati, I. 2011. Perbandingan Beberapa Metode Isolasi DNA untuk Deteksi Dini Koi Herpes Virus (KHV) pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika*.

- Novogene. (2021). from <https://en.novogene.com/services/research-services/metagenome-sequencing/16s-18s-its-amplicon-metagenomic-sequencing/>.
- Purwaningsih, I. 2013. Identifikasi Ektoparasit Protozoa pada Benih Ikan Mas (*Cyprinus carpio Linnaeus*. 1758) di Unit Kerja Budidaya Air Tawar (UKBAT) Cangkringan Sleman DIY. *Skripsi*. Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta.
- Rahmawan, M. E. A., Suminto, dan Herawati, V.E. 2017. Penggunaan Bakteri Kandidat Probiotik pada Pakan Buatan Terhadap Efisiensi Pakan, Pertumbuhan dan Kelulushidupan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 3(4): 257–264.
- Ray, A. K., Bairagi, A., Ghosh, K. S., dan Ken, S. K. 2007. Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 37(1): 47–53.
- Sabbathini, G. C., Pujiyanto, S., Wijanarka., dan Lisdiyanti, P. 201. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Genus *Sphingomonas* dari Daun Padi (*Oryza sativa*) di Area Pesawahan Cibinong. *Jurnal Biologi*. 6(1): 59-64.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., dan Maniatis, T. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. *Kimia*. 9(1): 117-123.
- Sugita, H., C. Miyajima, dan Y. Deguchi. 1990. The Vitamin B12-Producing Ability of Intestinal Bacteria Isolated from Tilapia and Channel Catfish. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*. 56: 701-701.
- Sullam, K.E., Essinger, S.D., Lozupone, C.A., O'Connor, M.P., Rosen, G.L., Knight, R., Kilham, S.S. *et al.* 2012. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular Ecology*. 21(13), 3363-3378.
- Susanti, I., Kusumangtyas, R.W., dan Illaningtyas, F. 2007. Uji Sifat Probiotik Bakteri Asam Laktat Sebagai Kandidat Bahan Pangan Fungsional. *Teknologi Dan Industri Pangan*, XVIII.
- Syahputra, H., Bakti, D., dan Kurnia, M.R. 2014. Studi komposisi makanan ikan sepat rawa (*Trichogaster trichopterus* Pallas) di Rawa Tergenang Desa Marundal Kecamatan Patumbak. *Aquacoastmarine*, 5(4): 60-71
- Tachibana, L., G. S. Telli, D. de. C. Dias, G. S. Gonçalves, M. C Guimarães, C. M. Ishikawa, R. B. Cavalcante, M.M. Natori, M. F. Fernandez Alarcon, S. Tapia-Paniagua, M. A. Moriñigo, F. J. Moyano, E. R. L de Araújo, dan M. J. T. Ranzani-Paiva. 2021. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effects on growth performance, gut microbiota modulation and innate immunology. *Aquaculture Research*, 52(4): 1630–1642.
<https://doi.org/10.1111/are.15016>

Yogananth, N., R. Bhagyaraj, A. Chanthuru, T. Anbalagan, dan M. Nila. 2009. Detection of Virulence gene in *Aeromonas hydrophila* isolates from fish samples using PCR technique. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 4(1): 51-53.

Kontribusi Penulis: Nurashila, A.S.: mengumpulkan data, menulis manuskrip, Mulyani, Y., Anna, Z.: analisis data dan pembahasan, Agung, M.U.K.: olah data