

LAPORAN PENELITIAN
PENAPISAN BAKTERI ASAM LAKTAT
DARI USUS IKAN AIR TAWAR



Dr. Agustina, S.Pi., M.Si.
(NIP 19770804 200312 2 002)
Adi Susanto, S.Pi., M.Si.
(NIP 19730120 200012 1 001)

JURUSAN BUDIDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS MULAWARMAN
SAMARINDA

2021

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Penapisan Bakteri Asama Laktat dari Usus Ikan Air Tawar

Ketua Peneliti
Nama Lengkap : Dr. Agustina, S.Pi., M.Si.
NIP : 19770804 200312 2 002
Jabatan Fungsional : Lektor
Prodi : Akuakultur
Email : agustina@fpik.unmul.ac.id

Anggota Peneliti
Nama Lengkap : Adi Susanto, S.Pi., M.Si.
NIP : 19730120 200012 1 001
Jabatan Fungsional : Lektor
Prodi : Akuakultur
Email : adisusanto@fpik.unmul.ac.id

Lama Penelitian : 2 bulan
Biaya Penelitian : Rp. 2.500.000,- (Dua juta lima ratus ribu rupiah)

Sumber Dana Penelitian : Mandiri

Samarinda, 12 April 2021

Mengetahui,
Dekan FPIK Unmul

Ketua Peneliti,

Prof. Dr. Ir. H. Iwan Suyatna, M.Sc. DEA., IPU.
NIP 19570813 198503 1 007

Dr. Agustina, S.Pi., M.Si.
NIP 19770904 200312 2 002

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kami panjatkan kehadirat Allah Subhanu wa Ta'ala atas rahmat dan berkah-Nya sehingga penyusunan laporan penelitian berjudul Penapisan Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Air Tawar ini bisa diselesaikan. Penyusunan laporan ini merupakan hasil penelitian kami dengan dukungan dari beberapa pihak yang terkait.

Perhargaan dan ucapan terima kasih penulis sampaikan dengan tulus kepada:

1. Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman, Samarinda.
2. Anggota tim peneliti yaitu Adi Susanto, S.Pi., M.Si. yang telah berpartisipasi dalam penelitian ini.
3. Ketua Laboratorium Mikrobiologi Perairan, FPIK Universitas Mulawarman yang telah memfasilitasi penelitian ini.
4. Tenaga laboran di Laboratorium Mikrobiologi Perairan, FPIK Universitas Mulawarman serta adik-adik mahasiswa yang telah membantu dalam penyiapan dan pelaksanaan penelitian di laboratorium.

Samarinda, 12 April 2021

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	2
C. Tujuan.....	3
D. Manfaat.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Biologi dan Sistematika Ikan Repang (<i>Puntioplites waandersi</i>).....	4
B. Klasifikasi dan Morfologi Ikan Puyau (<i>Osteochilus hasselti</i>).....	6
C. Bakteri Asam Laktat.....	7
D. Bakteri Asam Laktat dan Manfaatnya Bagi Organisme Akuatik	8
E. Penapisan Bakteri Asam Laktat sebagai Kandidat Probiotik	9
F. Bakteri Patogen pada Ikan Air Tawar	11
G. Bakteri Asam Laktat dan Manfaatnya Bagi Organisme Akuatik	14
BAB III. METODE PENELITIAN	16
A. Waktu dan tempat	16
B. Alat dan bahan	16
C. Kerangka Alur Penelitian	17
D. Desain Penelitian.....	18
E. Prosedur Penelitian	19
1. Tahap Persiapan	19
2. Tahap Pelaksanaan	19
a. Isolasi bakteri asam laktat dari usus ikan	19

b. Karakterisasi biokimia isolat bakteri asam laktat dari usus ikan.....	20
c. Uji sensitivitas bakteri asam laktat dari usus ikan terhadap antibiotik.....	20
d. Uji aktivitas antibakterial bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau terhadap bakteri patogen.....	20
e. Uji aktivitas antibakterial bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau terhadap bakteri patogen	21
F. Pengumpulan Data	22
G. Analisis Data	22
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	24
A. Hasil	24
1. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan	24
2. Sensitivitas Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan terhadap Antibiotik.....	25
3. Aktivitas Antibakterial Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan terhadap Patogen	26
4. Toleransi Isolat Bakteri Asam Laktat terhadap pH, Garam empedu dan NaCl dalam Media Tumbuhnya	27
B. Pembahasan	27
BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN	30
A. Kesimpulan	30
B. Saran.....	30
DAFTAR PUSTAKA.....	31

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 3.1. Kategori Zona Hambat terhadap Pertumbuhan Bakteri	23
Tabel 3.2. Diameter Zona Hambat Beberapa Antibiotik.....	23
Tabel 4.1. Karakteristik Isolat BAL dari Usus Ikan Repang.....	24
Tabel 4. 2. Karakteristik Isolat BAL dari Usus Ikan Puyau	25
Tabel 4. 3. Sensitivitas Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan	26
Tabel 4. 4. Diameter Zona Hambat Isolat BAL terhadap Patogen (mm)	26
Tabel 4. 5. Nilai Optical Density (OD) Isolat BAL pada Media dengan pH, Kadar Garam Empedu dan NaCl yang Berbeda	27

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2. 1. Ikan repang (<i>P. waandersi</i>) (Sumber: dokumen pribadi, 2021)	5
Gambar 2. 2. Ikan puyau (<i>L. festivus</i>) (dokumentasi pribadi, 2021)	7

BAB I.

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit bakterial merupakan masalah yang dihadapi dalam kegiatan budidaya biota akuatik. Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. merupakan dua jenis bakteri yang banyak ditemukan di tubuh ikan yang menunjukkan gejala sakit maupun normal, selain itu bakteri tersebut juga ditemukan di lingkungan perairan (Hardi dan Pebrianto 2012; Agustina *et al.*, 2014). Bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. termasuk dalam golongan bakteri fakultatif yang bisa menyebabkan masalah pada ikan ketika kondisi ikan lemah atau stress. Mortalitas ikan yang diinfeksi dengan kedua bakteri ini cukup tinggi yakni mencapai 50-80% (Hardi *et al.*, 2014; Agustina *et al.*, 2019). Kematian ikan budidaya terjadi akibat stress yang disebabkan oleh menurunnya kondisi lingkungan budidaya, seperti perubahan suhu yang terjadi secara drastis, meningkatnya bahan organik dari sisa pakan maupun dari aktivitas manusia di lingkungan sekitar wadah budidaya.

Upaya yang dilakukan untuk mengatasi hal ini adalah dengan meningkatkan kesehatan ikan dengan menggunakan bahan yang aman bagi ikan, lingkungan perairan maupun konsumennya. Probiotik merupakan produk yang terdiri dari mikroflora khususnya bakteri yang berperan menguntungkan bagi inang dengan cara meningkatkan kesehatannya dan dimanfaatkan dalam menanggulangi penyakit pada ikan (Caipang *et al.*, 2020; Hasan dan Banerjee, 2020). Beragam jenis bakteri yang berasal dari saluran pencernaan atau usus ikan yang diketahui mampu berperan sebagai probiotik, diantara kelompok bakteri asam laktat. Pemanfaatan probiotik dari bakteri asam laktat dalam kegiatan budidaya ikan didukung oleh hasil penelitian secara *in vitro* pada beberapa jenis ikan budidaya diantaranya pada ikan trout pelangi (*Oncorhynchus mykiss*) (Balcázar *et al.*, 2008), tilapia (*O. niloticus*) (Zapata dan Lara-Flores, 2013), ikan mas (*Cyprinus carpio*) (Kaktcham *et al.*, 2017), dan beberapa spesies ikan air tawar

(Hanol *et al.*, 2020) dan ikan air laut (Alonso *et al.*, 2019). Jenis bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai probiotik pada ikan antara lain *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus plantarum* dan *Leuconostoc mesenteroides* (Ringo *et al.*, 2018).

Potensi ikan lokal sebagai sumber bakteri probiotik perlu diteliti, mengingat ikan jenis ini masih melimpah di perairan Sungai Mahakam dan di danau-danau sekitarnya. Pada ikan kelabau (*Osteochilus melanopleurus*), beberapa bakteri memiliki potensi probiotik (Agustina *et al.*, 2018). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari usus ikan repang (*Puntioplites waandersi*) dan puyau (*Labiobarbus festivus*). Uji aktivitas antagonistik terhadap bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. serta toleransi terhadap berbagai media secara *in vitro* dilakukan pada penelitian ini sebagai tahap awal penapisan bakteri kandidat probiotik pada ikan repang dan ikan puyau.

B. Rumusan Masalah

Pada penelitian Penapisan Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Air Tawar ini dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut:

1. Jenis bakteri asam laktat apa saja yang bisa diisolasi dari usus ikan repang dan puyau?
2. Bagaimana sensitivitas bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau terhadap antibiotik?
3. Apakah isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. secara *in vitro*?
4. Bagaimana toleransi bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau terhadap pH, garam empedu, dan salinitas media secara *in vitro*?

C. Tujuan

Tujuan yang ingin dicapai dengan penelitian Penapisan Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Air Tawar ini adalah sebagai berikut:

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi secara biokimia jenis bakteri asam laktat yang diisolasi dari usus ikan repang dan puyau.
2. Mengevaluasi sensitivitas bakteri asam laktat terhadap enam jenis antibiotik komersil.
3. Mengevaluasi kemampuan antibakterial bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau terhadap bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. secara *in vitro*.
4. Mengevaluasi kemampuan toleransi bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau dalam media yang berbeda pH, garam empedu dan NaCl secara *in vitro*.

D. Manfaat

Hasil dari penelitian Penapisan Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Air Tawar ini diharapkan antara lain:

1. Menjadi referensi atau bahan rujukan bagi penelitian selanjutnya terkait pemanfaatan usus ikan sebagai sumber probiotik.
2. Sebagai upaya awal untuk menghasilkan produk probiotik terutama dari jenis bakteri asam laktat yang selanjutnya akan digunakan untuk membantu para pembudidaya ikan di daerah ini dalam menanggulangi penyakit bakterial.

BAB II.

TINJAUAN PUSTAKA

A. Biologi dan Sistematika Ikan Repang (*Puntioplites waandersi*)

Menurut Kottelat, *et al.* (1993) panjang tubuh *P. waandersi* dapat mencapai 50 sentimeter. Warna badan keperakan, bentuk tubuh pipih kompresid, memiliki sisik cycloid, tipe mulutnya terminal, tidak terdapat sungut, rumus sirip D.V.8; C.24; A.VII.2; V.VIII; P.8, dan bentuk ekornya bercagak. Daerah penyebaran *P. waandersi* adalah Sumatera, Kalimantan, Jawa, dan Indochina. Ikan repang (*P. waandersi*) dikenal dengan nama ikan kapas (Pontianak) atau ikan kapiat (Jambi) hasil tangkapan nelayan di Danau Bekat Kecamatan Tayan Hilir, Kalimantan Barat rata-rata dengan berat tubuh 40 gram, dan panjang tubuh 13,1 sentimeter (Januarinda, 2013).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Mulyanti (2020), ikan repang yang ditangkap di Desa Sungai Rambut Kecamatan Berbak Kabupaten Tanjung Jabung Timur, Jambi memiliki bentuk tubuh fusiform yaitu bentuk yang hampir meruncing pada kedua ujung. Memiliki bentuk punggung yang cekung. Sisik berwarna keperakan dan bentuk tubuh pipih. Ikan ini ditemukan bernaung di daerah yang banyak terdapat tanaman air. Ikan ini memiliki panjang total 11,8 cm, panjang setandar 8,5cm, tinggi badan 4,1 cm, panjang batang ekor 1,1 cm, tinggi batang ekor 1,2 cm, panjang di depan sirip punggung 4,6 cm, panjang pangkal sirip punggung 1,8 cm, panjang sirip dubur 1,5 cm, tinggi sirip punggung 3,9 cm, tinggi sirip dubur 2,8 cm, panjang sirip dada atau sirip perut 0,5/0,6 cm, panjang kepala 2,6 cm, lebar kepala 1,4 cm, panjang moncong 0,6 cm, diameter mata 0,8 cm, sirip dorsal atau punggung 1,7, sirip anal atau dubur 1,6, sirip pectoral/dada 15, sirip pelvic atau perut 8, lateral line 36, sisik melintang badan 15, sisik melintang batang ekor 6, memiliki potensi untuk konsumsi.

Ikan repang yang ditangkap di Danau Pinang Dalam, Desa Buluh Cina Kecamatan Siak Hulu, Kabupaten Kampar Provinsi Riau memiliki ciri-ciri badan

polos keperakkan, punggung berwarna hijau kecoklatan. Garis rusuk lengkap, jari-jari tidak bercabang yang terakhir dari sirip punggung bertulang. Jari-jari bertulang sirip punggung sebelah kebelakang bergerigi. Garis rusuk lengkap dengan 47 sisik, terdapat 9 sisik antara awal sirip punggung dan gurat sisi dan batang ekor dikelilingi 20 sisik. Jari-jari sirip D.I.9, P.20, V.9, A.I.5, batang ekor dikelilingi 20 sisik, antara garis rusuk dengan sirip punggung 9 sisik, garis rusuk dengan sirip perut 6 sisik (Kurnia *et al.*, 2014).

Hubungan panjang berat ikan repang adalah allometrik positif dengan persamaan $W = 0,006 L^{3,276}$ yang berarti pertumbuhan berat lebih cepat dari pertumbuhan panjangnya. Hidup di sungai-sungai utama dan anak sungai terutama yang banyak hutan rawa, baik di hulu sungai bahkan sampai ke daerah estuari. sebaran ikan repang di Sungai Batanghari mulai dari Pulau Musang hingga Muara Sabak. Makanan utamanya adalah tumbuhan dan zoobenthos, makanan pelengkap adalah serangga, sedangkan makanan tambahan berupa plankton dan cacing (Kaban *et al.*, 2016), namun menurut Utomo *et al.* (2010) pakan alami ikan repang atau cipuk adalah tumbuhan, benthos, serangga dan alga dasar.



Gambar 2.1. Ikan repang (*P. waandersi*) (Sumber: dokumen pribadi, 2021)

Sistematika ikan repang (*P. waandersi*) menurut Saanin (1984) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Actinopterygii
Ordo	: Cypriniformes
Famili	: Cyprinidae
Genus	: <i>Puntioplites</i>
Spesies	: <i>Puntioplites waandersi</i>

B. Klasifikasi dan Morfologi Ikan Puyau (*Osteochilus hasselti*)

Ikan puyau atau nilem di Indonesia dikenal dengan nama nilem, lehat, magut, regis, nilem, muntu, palung, palau, pawas, puyau, asang, penopa, dan karper (Saain, 1984). Ikan puyau atau nilem adalah salah satu jenis ikan air tawar anggota suku Cyprinidae, ordo Ostariophysi dengan nama ilmiah *Osteochilus hasselti*.

1. Klasifikasi Ikan Puyau

Klasifikasi ikan puyau, menurut Saain (1984) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub phylum	: Vertebrata
Kelas	: Pisces
Sub kelas	: Teleostei
Ordo	: Ostariophysi
Sub Ordo	: Cryprinoidae
Familia	: Cyprinidae
Sub familia	: Cyprininae
Genus	: <i>Labiobarbus</i>
Spesies	: <i>Labiobarbus festivus</i>

2. Morfologi Ikan Puyau

Ikan puyau atau nilem adalah ikan endemik yang hidup di sungai-sungai dan rawa-rawa. Ikan puyau memiliki ciri-ciri yang hampir sama dengan ikan mas. Ikan puyau memiliki mulut yang terdapat dapat dua pasang sungut peraba, sirip punggung disokong oleh 3 jari keras dan 12-18 jari-jari lunak. Sirip ekor berjagak dua, bentuknya simetris, sirip dubur disokong oleh 3 jari-jari lunak dan 5 jari-jari lunak. Sirip perut disokong oleh 1 jari-jari keras dan 13-15 jari-jari lunak serta memiliki jumlah sisik-sisik gurat ada 33-36 keping. Bentuk tubuh ikan puyau agak memanjang dan pipih, ujung mulutnya runcing dengan moncong (rostral) terlipat, serta memiliki bintim hitam besar pada ekornya, selain itu ikan puyau termasuk kelompok omnivora yang mengkonsumsi makanan berupa ganggang penempel atau disebut epifitton dan perifitton (Djuhanda, 1985).



Gambar 2.2. Ikan puyau (*L. festivus*) (dokumentasi pribadi, 2021)

C. Bakteri Asam Laktat

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan kelompok dari bakteri gram positif yang tidak menghasilkan spora, berbentuk coccus atau basil dan memproduksi asam laktat sebagai produk akhir selama proses memfermentasikan karbohidrat atau gula (Hasanah, 2014 dan Romadhon dan Margino, 2012). Bakteri asam laktat termasuk dalam kelompok bakteri baik yang umumnya memenuhi status GRAS (Generally Recognized as Safe) yang artinya aman bila dikonsumsi oleh manusia maupun hewan, sehingga dapat diaplikasikan sebagai agen probiotik. Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan bakteri anaerob fakultatif yang mampu hidup pada

habitat yang cukup luas, seperti saluran pencernaan hewan dan manusia, makanan kalengan, produk susu, produk fermentasi, buah-buahan, dan sayur-sayuran tropis. Bakteri Asam Laktat (BAL) telah digunakan sebagai pengawet makanan, kultur fermentasi, dan pangan probiotik karena mempunyai aktivitas antimikroba dan pembusuk makanan (Rahmiati dan Mumpuni 2017).

Sunaryanto et al. (2014) mengisolasi bakteri *Lactobacillus casei* dari susu fermentasi yang berperan sebagai probiotik. Isolat ini mampu menghambat pertumbuhan *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Enterococcus faecalis*. Peranan terpenting BAL adalah memproduksi komponen antimikroba, seperti bakteriosin. Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dapat berupa protein yang memberikan efek bakterisidal yang merupakan biopreservatif pada bahan makanan dan memperpanjang umur simpan produk. Beberapa probiotik yang merupakan flora normal pada saluran pencernaan telah berhasil diisolasi antara lain bakteri asam laktat (BAL), seperti dilaporkan oleh Nelintong et al. (2015).

D. Bakteri Asam Laktat dan Manfaatnya Bagi Organisme Akuatik

Komunitas mikroba yang dinamis dan kompleks memiliki peran penting dalam saluran pencernaan ikan. Secara umum, dari bakteri yang hidup di saluran pencernaan ikan, bakteri asam laktat dianggap sebagai mikroorganisme yang menguntungkan karena kemampuannya untuk merangsang perkembangan saluran pencernaan inang, fungsi pencernaan, toleransi mukosa, merangsang respon imun, dan peningkatan sensitivitas terhadap penyakit. Sejumlah strain bakteri asam laktat menunjukkan aktivitas antibakterial terhadap bakteri patogen pada ikan maupun manusia (Ringo, et al., 2018).

Bakteri asam laktat diklasifikasikan dalam filum Firmicutes, kelas Bacillus, dan ordo Latobacillales. Bakteri ini termasuk Gram-positif, non-endospora, dengan morfologi berbentuk batang atau bulat (kokus), bersifat katalase negatif dan oksidase negatif dan kebanyakan dari mereka adalah non-motil. Pertumbuhan

optimum bakteri asam laktat umumnya pada pH 5,5-5,8, dan memiliki kebutuhan nutrisi yang kompleks. Mereka dibagi menjadi homofermentatif dan heterofermentatif. Homofermentatif menghasilkan asam laktat dari gula, sedangkan heterofermentatif menghasilkan asam laktat, asam asetat atau alkohol, dan karbon dioksida. Sifat yang menguntungkan dari bakteri asam laktat adalah mereka menghasilkan substansi penghambat pertumbuhan seperti bakteriosin, hidrogen peroksida, diasil, dan lain-lain; mencegah proliferasi patogen dan bakteri pembusuk di makanan (Alakomi *et al.*, 2000; De Vuyst and Leroy, 2007).

Keberadaan bakteri asam laktat dalam saluran pencernaan ikan mengalami variasi dipengaruhi oleh variasi musim. Seperti juga keberadaan mikroba patogen yang sangat tergantung pada kondisi musim (Ringø *et al.*, 2016). Hal lain yang berpengaruh adalah jenis makanan, baik yang tersedia secara alami di lingkungan perairan terkait dengan perubahan musim, maupun penambahan bahan tertentu di dalam pakan pada kegiatan budidaya ikan seperti xylooligosaccharide (Hoseinifar *et al.*, 2016). Beberapa genus bakteri asam laktat yang sudah diteliti dan menunjukkan potensi sebagai probiotik pada ikan yaitu *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weisella*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, dan *Vagococcus* (Ringo, *et al.*, 2018).

E. Penapisan Bakteri Asam Laktat sebagai Kandidat Probiotik

Kegiatan budidaya organisme akuatik yang semakin berkembang berdampak pada menurunnya kualitas lingkungan dan meningkatnya kasus kejadian penyakit bakterial, sehingga perlu alternatif yang tepat dalam mengendalikannya. Pemanfaatan substansi antibakterial dari mikroba yang hidup di dalam tubuh, terutama saluran pencernaan ikan perlu dikembangkan untuk mengatasi hal tersebut (Sahoo *et al.*, 2016). Agen antibakterial yang berasal dari

bakteri seperti antibiotik, bakteriosin, lysozyme, protease, siderophore, dan atau hidrogen peroksida dan produksi asam organik (Mukherjee *et al.*, 2016).

Bakteriosin, adalah peptide ribosom sintetis antimikrobal dan bakteri asam laktat secara umum menghasilkan zat ini (Silva *et al.*, 2018). Bakteriosin merupakan molekul kationik kecil yang terdiri dari 30-60 asam amino, membentuk heliks amfifilik dan stabil pada suhu 100 °C selama 10 menit. Menurut Elayaraja *et al.* (2014), genus *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, dan *Carnobacterium* menghasilkan beragam jenis bakteriosin. Uji secara *in vitro* bisa dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakterial dari bakteri asam laktat, baik berupa sel utuh (Zapata and Lara-Flores, 2013; Amin *et al.*, 2016; Hanol *et al.*, 2020) maupun hanya menggunakan bakteriosin (Gómez-Sala *et al.*, 2015).

Calon probiotik yang baik memiliki ketahanan terhadap garam empedu dan protease, bisa menurunkan pH usus dengan menghasilkan asam laktat sehingga bisa mencegah pertumbuhan bakteri patogen, mengurangi produksi beberapa toksin dan metabolit yang bersifat karsinogenik. Peranan lain seperti membantu penyerapan mineral seperti kalsium karena meningkatnya keasaman usus dan mampu menghasilkan senyawa seperti bakteriosin, asam organik dan hidrogen peroksida yang menghambat mikroba patogen, dan vitamin B dan K. Bakteri asam laktat memiliki kemampuan seperti yang disebutkan di atas dan bakteri ini ditemukan di alam (Perez-Sanchez *et al.*, 2011). Oleh karena itu, isolasi dan identifikasi bakteri di saluran cerna sistem ikan menjadi penting. Sejak tes fenotipik dan biokimia digunakan untuk identifikasi bakteri asam laktat mulai tidak memadai, metode biologi molekuler lalu digunakan baru-baru ini. Melalui metode biologi molekuler, lebih mungkin untuk memahami karakterisasi mikrobiota lambung dan usus, dan interaksi bakteri dengan bakteri dan bakteri dengan inang yang sakit dan sehat (Liu *et al.*, 2008).

F. Bakteri Patogen pada Ikan Air Tawar

Bakteri *Aeromonas hydrophila* termasuk dalam famili Vibrionaceae, genus *Aeromonas* dengan karakteristik antara lain berbentuk batang pendek, gram negatif dan fakultatif anaerobik (Roberts, 2012). Menurut Noga (2010) bakteri ini bersifat motil, berukuran 0,8-1,0x1,0-3,5 μm dengan flagella tunggal, disebut juga *A. formicans* dan *A. liquefaciens*, ditemukan sebagai patogen yang menyerang jenis ikan air tawar, dan beberapa ikan air laut. Bakteri ini umum ditemukan pada permukaan tubuh dan organ dalam ikan yang sehat. Bakteri *A. hydrophila* terdiri dari galur virulen, virulen lemah, dan non virulen.

Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri fakultatif yang banyak ditemukan menjadi penyebab penyakit ulceratif atau yang dikenal sebagai penyakit motil aeromonas septicemia, atau bercak merah yang dominan menyerang ikan-ikan budidaya (Song *et al.*, 2014). Li *et al.* (2013), juga mendukung hal tersebut dengan menyatakan bahwa bakteri ini merupakan patogen oportunistik yang hanya menyebabkan penyakit pada ikan yang kondisinya stress akibat penurunan kualitas air. Prevalensi penyakit ini tinggi pada kondisi perairan yang tercemar bahan organik, padat penebaran yang tinggi, dan rendahnya kadar oksigen terlarut (hypoxia). Pada kasus terjadinya penyakit bercak merah ini, bakteri *A. hydrophila* merupakan penginfeksi sekunder pada jaringan tubuh yang luka oleh jamur atau ektoparasit seperti protozoa (Noga, 2010). Bakteri *A. hydrophila* ini bisa diisolasi dari ikan yang sehat maupun ikan yang menunjukkan gejala abnormalitas (Manshadi dan Assareh, 2014).

Menurut Noga (2010); Khatun *et al.* (2011), ikan yang terinfeksi bakteri ini akan menunjukkan gejala seperti adanya luka pada permukaan tubuh sampai otot, luka di daerah insang, *ulcus* atau luka terbuka, *abses* atau bisul, *exophthalmus* atau mata tampak menonjol, perut membengkak karena akumulasi cairan, kerusakan pada beberapa organ dalam seperti ginjal, dan hati. Kondisi ini disebabkan antara lain adanya produk ekstraseluler dari bakteri *A. hydrophila* berupa enterotoksin, sitotoksin, hemolisin, lipase dan protease. Pada ikan mas bakteri *A. hydrophila*

menyebabkan apoptosis karena menghasilkan eksotoksin (Shao *et al.*, 2004). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Agustina *et al.* (2014), yang mengisolasi bakteri *A. hydrophila* pada mata, insang, ginjal, otak dan hati beberapa ikan budidaya seperti patin, mas dan nila dengan prevalensi sekitar 60,76-93,33% dan ikan yang dijadikan sampel tersebut rata-rata terlihat normal atau tidak menunjukkan perubahan patologis. Pada perairan umum, ikan nila yang terinfeksi *A. hydrophila* menunjukkan *ulcus* pada permukaan tubuhnya, lemah, lesu, luka yang menghitam pada kulit, sirip geripis, dan mata menonjol teramati pada penelitian El-Atta dan Tantawy (2008).

Pada banyak kasus serangan penyakit oleh bakteri *A. hydrophila* terjadi peradangan pada usus ikan (enteritis) sehingga bakteri ini umum dikenal sebagai penyebab penyakit usus pada ikan, terutama sebagai penyebab kematian ikan-ikan air tawar yang dibudidaya, antara lain ikan Mas (Kumar dan Ramulu, 2008), dan ikan nila (Ibrahim *et al.*, 2008). Bakteri ini masuk ke dalam tubuh ikan melalui insang dan kulit yang luka, menyebabkan apoptosis sel makrofag, merusak lapisan mukosa usus yang berdampak pada menurunnya kemampuan mukosa usus melawan patogen. Bakteri *A. hydrophila* yang diinfeksi pada ikan lele dumbo (*Clarias sp.*) dengan dosis 10^6 CFU/mL mampu menyebabkan kematian mencapai 60% (Angka, 2005). Pada usus ikan grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) yang mengalami peradangan akibat infeksi buatan dengan bakteri *A. hydrophila* maka vili usus juga mengalami fusi, kemudian lepas serta meningkatnya jumlah sel radang (Song *et al.*, 2014). Strzyzewska *et al.* (2016) menyatakan bahwa akibat *hiperplasia* yang terjadi secara terus menerus maka terjadi *proliferasi* sel mukosa yang menyebabkan lapisan epitel terlihat berlapis-lapis dan akibat dari reaksi tersebut adalah kematian sel (nekrosis) epitel usus yang ditandai dengan banyaknya lendir atau mukosa yang dihasilkan pada permukaan usus. Perubahan histopatologi usus channel catfish (*Ictalurus punctatus*) yang diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* menunjukkan terjadinya *nekrosis* (Abdelhamed *et al.*, 2017).

Perubahan histopatologi ditunjukkan pada otak ikan berupa kongesti dan nekrosis (Aekanurmaningdyah dan Kurniasih, 2018).

Menurut Holt *et al.* (1994), bakteri *Pseudomonas* sp. merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang berukuran sekitar 0,5-1,0x1,5-5,0 μm dan bersifat motil dengan adanya satu atau beberapa flagel. Pada siklus hidupnya bakteri ini tidak membentuk spora dan metabolisemenya bersifat aerobik. Bakteri ini hidup bebas di alam, sehingga banyak ditemukan di air maupun tanah. Bakteri *Pseudomonas* sp. ditemukan dalam beberapa organ ikan baik yang sehat maupun yang menunjukkan gejala abnormalitas atau sakit, misalnya ikan patin, ikan Mas dan nila yang dibudidayakan di dalam keramba di Sungai Mahakam (Hardi dan Pebrianto, 2012; Agustina *et al.*, 2014).

Gejala klinis yang ditunjukkan oleh ikan yang terinfeksi antara lain berenang berputar (*whirling*), rusaknya sirip, mata mengalami *opacity* dan *eksoptalmia*, pecahnya kandung empedu dan warna organ internal menjadi pucat (Hardi dan Pebrianto, 2012). Bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. ditemukan menginfeksi ikan-ikan budidaya di perairan Sungai Mahakam dengan gejala klinis yang ditunjukkan hampir sama, berupa luka atau ulcer pada permukaan tubuh dan kerusakan pada organ internal ikan. Otak dan mata juga merupakan organ dimana kedua bakteri ini banyak ditemukan (Agustina *et al.*, 2014). Pada penelitian Hossain dan Chowdhury (2009) ditemukan peningkatan jumlah melanomakrofag pada limfa dan ginjal ikan yang diinfeksi bakteri *P. anguilliseptica*.

Hardi (2012) menemukan bahwa bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. memiliki tingkat patogenitas yang berbeda pada ikan nila setelah diinjeksi dengan konsentrasi masing-masing bakteri sebesar 10^{10} CFU/ml 0,1 ml/ekor. Pada dosis tersebut terlihat bahwa ikan yang diinfeksi dengan bakteri *Pseudomonas* sp. lebih cepat mengalami perubahan patologi anatomi dan kematian mencapai 80%, lebih tinggi jika dibanding dengan kelompok ikan yang diinjeksi dengan bakteri *A. hydrophila*. Patogenitas dari bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp.

disebabkan oleh banyak faktor. Produk ekstraseluler dari kedua bakteri diduga sebagai salah satu faktor virulensi yang mengandung beberapa enzim dan hemolisin, kedua bahan ini yang menyebabkan sitotoksik, sitolitik, hemolitik dan enterotoksik pada ikan yang terinfeksi (Sahu *et al.*, 2011). Hal ini dibuktikan pada percobaan Hardi *et al.* (2014), produk selular yang dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas* sp. berupa ECP (Extra Celular Product) dan ICP (Intra Celular Product) mampu menyebabkan perubahan patologi anatomi ikan nila dan kematian setelah diinjeksikan pada ikan tersebut.

E. ictaluri sebagai penyebab utama *Enteric Septicemia* dapat mengakibatkan kematian 10%-50% pada catfish. Pada infeksi akut, kematian dapat terlihat pada hari ke-4 sampai hari ke-12. *E. ictaluri* umumnya menyerang golongan catfish dan dikenal dengan penyakit *Hole in the Head Disease* karena menyebabkan lesi terbuka pada daerah kepala (Keskin *et al.*, 2004). Ikan nila dapat mengalami kematian sampai 40% pada infeksi bakteri dengan konsentrasi 10³ cfu/mL (Soto *et al.*, 2012). Isolat bakteri *E. ictaluri* kode PJh-01 asal Jatiluhur memiliki tingkat patogenitas lebih tinggi dari isolat lain yang diuji dengan nilai LD50 yaitu sebesar 3,23x10⁷ cfu/mL (Purwaningsih *et al.*, 2019).

G. Bakteri Asam Laktat dan Manfaatnya Bagi Organisme Akuatik

Komunitas mikroba yang dinamis dan kompleks memiliki peran penting dalam saluran pencernaan ikan. Secara umum, dari bakteri yang hidup di saluran pencernaan ikan, bakteri asam laktat dianggap sebagai mikroorganisme yang menguntungkan karena kemampuannya untuk merangsang perkembangan saluran pencernaan inang, fungsi pencernaan, toleransi mukosa, merangsang respon imun, dan peningkatan sensitivitas terhadap penyakit. Sejumlah strain bakteri asam laktat menunjukkan aktivitas antibakterial terhadap bakteri patogen pada ikan maupun manusia (Ringo, *et al.*, 2018).

Bakteri asam laktat diklasifikasikan dalam filum Firmicutes, kelas Bacillus, dan ordo Latobacillales. Bakteri ini termasuk Gram-positif, non-endospora,

dengan morfologi berbentuk batang atau bulat (kokus), bersifat katalase negatif dan oksidase negatif dan kebanyakan dari mereka adalah non-motil. Pertumbuhan optimum bakteri asam laktat umumnya pada pH 5,5-5,8, dan memiliki kebutuhan nutrisi yang kompleks. Mereka dibagi menjadi homofermentatif dan heterofermentatif. Homofermentatif menghasilkan asam laktat dari gula, sedangkan heterofermentatif menghasilkan asam laktat, asam asetat atau alkohol, dan karbon dioksida. Sifat yang menguntungkan dari bakteri asam laktat adalah mereka menghasilkan substansi penghambat pertumbuhan seperti bakteriosin, hidrogen peroksida, diasil, dan lain-lain; mencegah proliferasi patogen dan bakteri pembusuk di makanan (Alakomi *et al.*, 2000; De Vuyst and Leroy, 2007).

Keberadaan bakteri asam laktat dalam saluran pencernaan ikan mengalami variasi dipengaruhi oleh variasi musim. Seperti juga keberadaan mikroba patogen yang sangat tergantung pada kondisi musim (Ringø *et al.*, 2016). Hal lain yang berpengaruh adalah jenis makanan, baik yang tersedia secara alami di lingkungan perairan terkait dengan perubahan musim, maupun penambahan bahan tertentu di dalam pakan pada kegiatan budidaya ikan seperti xylooligosaccharide (Hoseinifar *et al.*, 2016). Beberapa genus bakteri asam laktat yang sudah diteliti dan menunjukkan potensi sebagai probiotik pada ikan yaitu *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weisella*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, dan *Vagococcus* (Ringo, *et al.*, 2018).

BAB III.

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian 'Penapisan Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Air Tawar' dilaksanakan pada Februari-Maret 2021 di Laboratorium Mikrobiologi Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Mulawarman.

B. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan untuk menunjang penelitian 'Penapisan Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Air Tawar' adalah sebagai berikut:

1. Sampel isi usus ikan repang dan puyau digunakan sebagai sumber isolat bakteri kandidat probiotik diambil dari saluran pencernaan, mulai dari kerongkongan sampai anus. Ikan repang dan puyau yang digunakan sebagai sumber atau asal isolat bakteri berukuran berat sekitar 40,04 g dan panjang sekitar 15,39 cm sebanyak 10 ekor yang berasal dari tangkapan nelayan di Sungai Mahakam Kecamatan Kota Bangun, Kabupaten Kutai Kartanegara. Sampel ikan ini diambil berdasarkan tangkapan nelayan saja sehingga tidak ditentukan ukuran panjang ataupun beratnya.
2. Isolat bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. merupakan koleksi dan Laboratorium MBA FPIK, Universitas Mulawarman.
3. Isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau digunakan pada uji secara *in vitro*.
4. Media deMan Rogose Sharpe Agar (MRSA) digunakan sebagai media tanam atau isolasi bakteri asam laktat, media deMan Rogose Sharpe Broth (MRSB) digunakan untuk menyuburkan biakan bakteri asam laktat sebelum digunakan pada tiap tahap pengujian, media Tryptic Soy Agar (TSA) digunakan sebagai media tanam untuk uji *in vitro* dan penyimpanan isolat bakteri usus ikan repang dan puyau maupun bakteri patogen, serta

media Tryptic Soy Broth (TSB) digunakan untuk menyuburkan biakan bakteri sebelum digunakan pada beberapa tahap pengujian.

5. Paper disk blank digunakan untuk menempatkan bakteri, dan Phosphat Buffer Saline (PBS) pada tahap uji daya hambat secara *in vitro*.
6. Akuades, dan paper disk antibiotik Oxytetracycline, Nalidixic Acid, Gentamycin, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Norfloxacin, digunakan pada uji sensitivitas isolat bakteri asam laktat terhadap antibiotik.
7. NaCl, fresh bile salt (empedu sapi yang segar), NaOH dan HCl untuk uji toleransi terhadap garam, garam empedu, dan pH media.
8. Media O/F, media Sulfid Indol Motility (SIM), media Methyl Red dan Voges Proskaurt (MR/VP) dan media Triple Sugar Iron Agar (TSIA) digunakan pada uji karakterisasi atau identifikasi secara biokimia dan beberapa reagent kit untuk uji identifikasi biomolekuler isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau.
9. Tisue dan alkohol 70% untuk sterilisasi.

Alat-alat yang digunakan untuk menunjang penelitian 'Penapisan Bakteri

Asam Laktat dari Usus Ikan Air Tawar' adalah sebagai berikut:

1. Laminar air flow digunakan saat preparasi bakteri.
2. Dissecting set (alat bedah) digunakan untuk preparasi usus ikan repang dan puyau dan organ dalam lainnya.
3. Petridish, tabung reaksi, erlenmeyer, mikro pipet dan jarum ose untuk preparasi isolat bakteri.
4. Hot plate, magnetic stirrer, homogenizer, inkubator, sentrifuge, autoclave dan oven untuk preparasi isolat bakteri.
5. Mikroskop merk Olympus BX41 digunakan saat pengamatan bakteri.
6. Kamera untuk mendokumentasikan kegiatan penelitian.

C. Kerangka Alur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu: Tahap I isolasi dan karakterisasi atau identifikasi isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan

puyau secara biokimia. Tahap II uji sensitivitas isolat bakteri asam laktat terhadap antibiotik. Tahap III uji daya hambat isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau terhadap bakteri patogen secara *in vitro* dan. Tahap IV uji toleransi isolat bakteri asam laktat terhadap pH media, kadar garam (NaCl) dan garam empedu.

D. Desain Penelitian

Pada penelitian 'Penapisan Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Air Tawar' digunakan dua desain yaitu desain survey dan eksperimental laboratorium. Desain masing-masing tahap sebagai berikut:

1. Isolasi bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau untuk uji karakterisasi biokimia isolat tersebut. Uji ini menggunakan desain survey dengan mengeksplorasi sepuluh sampel usus ikan repang dan puyau untuk mendapatkan isolat murni bakteri asam laktat.
2. Pada uji sensitivitas lima isolat terhadap enam jenis antibiotik, digunakan enam perlakuan dan tiga ulangan yang terdiri dari lima isolat bakteri asam laktat dan satu kontrol negatif (PBS).
3. Uji daya hambat secara *in vitro* isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau terhadap bakteri patogen (*A. hydrophila* dan *Pseudomonas sp.*). Pada uji ini menggunakan desain eksperimental laboratorium yang terdiri dari tujuh perlakuan dan tiga ulangan yang terdiri dari lima isolat bakteri asam laktat, satu kontrol positif (antibiotik oxytetracyclin) dan satu kontrol negatif (larutan PBS).
4. Uji toleransi terhadap pH media, kadar garam (NaCl), dan garam empedu dalam media isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang menggunakan desain eksperimental laboratorium dengan lima perlakuan dan tiga ulangan.

E. Prosedur Penelitian

Penelitian 'Penapisan Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Air Tawar' dilakukan beberapa tahap meliputi persiapan dan pelaksanaan, seperti diuraikan di bawah ini:

1. Tahap Persiapan

Ikan repang dan puyau sebagai sumber isolat bakteri probiotik dibawa melalui jalur darat, dengan dimasukkan ke dalam kantong plastik rangkap dua yang berisi air dan oksigen. Kantong plastik yang berisi ikan lalu dimasukkan ke dalam kotak stereofoam dan di sekeliling plastik diletakan sedikit bongkahan kecil es batu, agar suhu tetap dingin selama perjalanan dari Kecamatan Kota Bangun Kabupaten Kutai Kartanegara menuju Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Akuatik Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman di Samarinda.

2. Tahap pelaksanaan

a. Isolasi bakteri asam laktat dari usus ikan

Bakteri asam laktat diisolasi dari sepuluh ekor ikan repang dan puyau yang berasal dari Sungai Mahakam di Kecamatan Kota Bangun Kabupaten Kutai Kartanegara Kalimantan Timur. Ikan repang dimasukkan ke dalam wadah yang berisi air dengan volume 30 L yang sebelumnya sudah dicampur dengan batu es sampai suhu air dalam wadah sekitar 15 °C selama sekitar 30 menit untuk membius ikan. Ikan lalu diangkat dari air dingin dan sebelum dibedah terlebih dahulu tubuh ikan disemprot dengan alkohol 70% untuk menghindari kontaminasi mikroba. Usus masing-masing sepuluh ekor ikan repang dan puyau lalu dikeluarkan dari rongga perut secara aseptik, lalu isi usus dikeluarkan dan dihomogenkan. Langkah berikutnya satu gram isi usus dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL PBS steril dan diencerkan sebanyak lima kali (10-5), lalu 0,1 mL larutan usus ditanam di media MRSA (de Man Rogosa and Sharpe Agar) MERCK dengan cara disebar lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 oC. Koloni yang tumbuh selanjutnya direisolasi pada media MRSA sebanyak tiga kali

untuk mendapat isolat bakteri asam laktat yang murni. Sebanyak lima isolat murni bakteri asam laktat lalu ditanam dan diinkubasi kembali dalam biakan miring media MRSA dan media MRSB (de Man Rogosa and Sharpe Broth) MERCK lalu disimpan pada suhu 4 oC untuk uji selanjutnya (Hanol et al., 2018; Patel et al., 2020).

b. Karakterisasi biokimia isolat bakteri asam laktat dari usus ikan

Lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau dengan kode P1, P2, P3, P4 dan P5 selanjutnya dikarakterisasi atau diidentifikasi berdasarkan sifat kimiawinya. Uji ini meliputi pengamatan morfologi sel yang meliputi uji pewarnaan Gram, bentuk sel dan uji motilitas, serta uji sifat fisiologis yaitu uji katalase, uji indol, uji MR-VP, uji Simmons Citrate, dan uji TSIA sesuai dengan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt et al., 1994).

c. Uji sensitivitas bakteri asam laktat dari usus ikan terhadap antibiotik

Pada uji ini digunakan teknik difusi (Patel et al., 2020). Lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau diinokulasikan ke dalam media MRSA dan dibiarkan mengering sekitar 1 jam lalu diletakkan disk antibiotik di atasnya. Antibiotik yang digunakan terdiri enam jenis yaitu: Oxytetracycline (30 mcg), Nalidixic Acid (30 mcg), Gentamycin (10 mcg), Ciprofloxacin (10 mcg), Chloramphenicol (30 mcg), Norfloxacin (10 mcg). Biakan lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 oC.

d. Uji aktivitas antibakterial bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau terhadap bakteri patogen

Bakteri asam laktat yang diisolasi dari usus ikan repang dan puyau diuji kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. dengan metode difusi dan dilakukan dengan tiga ulangan (modifikasi dari Hanol et al., 2018). Biakan cair *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp. dan isolat bakteri asam laktat diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C dalam media MRSB, biakan lalu disentrifuge 7000 rpm pada suhu ruang selama 10 menit lalu diencerkan hingga memiliki konsentrasi yang sama yaitu 10⁶ CFU/mL. Biakan

bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. masing-masing disebar pada media TSA sebanyak 0,1 mL, lalu kertas cakram yang sudah ditetesi 0,05 mL isolat bakteri asam laktat yang berasal dari usus ikan repang dan puyau diletakkan di atas media MRSA yang masing-masing sudah ditanam *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. Perlakuan kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik Oxytetracycline dan kontrol negatif menggunakan larutan PBS. Biakan tersebut selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Isolat yang menghasilkan zona bening berarti menunjukkan kemampuan menghambat bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp.

e. Uji toleransi bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau terhadap media yang berbeda

Pada uji ini isolat bakteri asam laktat diuji toleransinya pada media dengan pH 2, 4 dan 8 mengikuti metode Patel *et al.* (2020). Media MRSB dengan pH yang berbeda yaitu 2, 4, dan 8 disiapkan menggunakan HCl 1% (Sigma) dan NaOH 1 N (Sigma) dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu disterilkan dengan autoclave selama 15 menit pada suhu 121 °C selanjutnya 1% (v/v) biakan bakteri asam laktat yang berumur 24 jam diinokulasi ke dalam media MRSB dengan pH berbeda si diinkubasi pada 37 °C selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri diamati dengan menilai kekeruhan (densitas optik) dengan menggunakan spektrofotometer 600 nm.

Uji toleransi terhadap garam empedu menggunakan empedu sapi segar dengan konsentrasi 1%, 2% dan 3%, sedangkan toleransi terhadap garam menggunakan NaCl dengan konsentrasi 3%, 5% dan 7%. Metode ini merupakan modifikasi dari Patel *et al.* (2020) yaitu dengan menggunakan empedu sapi yang masih segar (cair). Media MRSB yang steril dimasukkan tabung reaksi dengan konsentrasi NaCl dan garam empedu sesuai perlakuan. Sebanyak 9,9 mL larutan MRSB yang sudah diberi perlakuan lalu ditambahkan masing-masing 0,1 mL biakan bakteri asam laktat yang berumur 24 jam. Biakan dalam tabung reaksi tersebut lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri

diamati dengan menilai kekeruhan (densitas optik) dengan menggunakan spektrofotometer 600 nm.

F. Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan pada penelitian 'Penapisan Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (*P. waandersi*) dan Puyau (*O. hasselti*)' adalah sebagai berikut:

1. Karakter lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau, meliputi uji biokimiawi yang terdiri dari: uji pewarnaan Gram, bentuk sel dan uji motilitas, uji katalase, uji indol, uji MR-VP, dan uji TSIA sesuai dengan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994).
2. Sensitivitas bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau terhadap enam jenis antibiotik diukur berdasarkan luas zona bening di sekitar paper disk antibiotik (mm).
3. Kemampuan daya hambat isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau terhadap bakteri patogen diukur berdasarkan luas zona bening di sekitar paper disk yang mengandung bakteri asam laktat (mm).
4. Kemampuan toleransi isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau pada media yang berbeda diukur dengan nilai densitas optik pada pengukuran dengan spektrofotometer 600 nm.

G. Analisis Data

Seluruh data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis secara deskripsi dalam bentuk gambar dan tabel. Data berupa diameter zona hambat yang diperoleh pada penelitian ini dibandingkan dengan diameter daya hambat antibiotik menurut Davis dan Stout (1971) dan Mayer (2007). Isolat bakteri usus ikan repang dan puyau dengan kisaran diameter sedang-kuat dari uji sebelumnya kemudian dilihat kemampuan saling menghambat untuk mengetahui hubungan antar isolat tersebut. Analisis ini juga merujuk pada diameter daya hambat

antibiotik menurut Davis dan Stout (1971) dan Mayer (2007) pada Tabel 3.1 dan 3.2.

Tabel 3.1. Kategori Zona Hambat terhadap Pertumbuhan Bakteri

Kategori	Diameter zona hambat (mm)
Sangat kuat	> 20
Kuat	10-20
Sedang	5-10
Lemah/tidak ada respon	< 5

Sumber: Davis dan Stout (1971)

Tabel 3.2. Diameter Zona Hambat Beberapa Antibiotik

Antibiotik	Kategori daya hambat (mm)		
	Resisten	Intermediet	Rentan
Chloramphenicol	≤ 12	13-17	≥ 18
Erythromycin	≤ 13	14-17	≥ 19
Nalidixid Acid	≤ 13	14-18	≥ 19
Streptomycin	≤ 11	12-14	≥ 15
Tetracyclin	≤ 14	15-18	≥ 19
Trimethoprim	≤ 10	11-15	≥ 16

Sumber: Mayer (2007)

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan

Pada penelitian ini berhasil diisolasi 10 isolat bakteri asam laktat (BAL) dari usus ikan repang dan ikan puyau. Kesepuluh isolat tersebut, lima berasal dari usus ikan repang (R1, R2, R3, R4 dan R5) dan lima isolat dari usus ikan puyau (P1, P2, P3, P4 dan P5). Isolat-isolat bakteri tersebut selanjutnya diuji karakteristiknya secara biokimiawi berdasarkan Holt *et al.* (1994) dan hasil uji tersebut menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat yang berasal dari usus ikan repang dan puyau dikategorikan dalam tiga genus yaitu *Enterococcus* (R1, R2, P2, dan P4), *Lactobacillus* (R3 dan P3) dan *Lactococcus* (R4, R5, P1, dan P5). Karakteristik ketiga genus tersebut dicantumkan di Tabel 4.1 dan 4.2.

Tabel 4.1. Karakteristik Isolat BAL dari Usus Ikan Repang

Karakteristik	R1	R2	R3	R4	R5
Bentuk koloni	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat
Warna	Putih	Putih	Putih susu	Putih susu	Putih susu
Elevasi	Cembung	Cembung	Cembung	Cembung	Cembung
Pinggiran	Halus	Halus	Halus	Halus	Halus
Bentuk sel	Coccus	Coccus	Bacillus	Coccus	Coccus
Pengaturan sel	Streptococcus	Streptococcus	Diplobacillus	Diplococcus	Streptococcus
Pewarnaan gram	+	+	+	+	+
Motilitas	+	+	-	-	-
Katalase	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	+	+	+	+
Metil-red	-	-	+	+	+
Produksi asam dari karbohidrat					
Glukosa	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+
Sukrosa	+	+	+	+	+
Laktosa	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	+	+	+
Mannitol	-	-	+	-	+
Produksi H ₂ S	-	-	-	-	-
Produksi gas	-	-	-	-	-
Genus	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus</i>

Tabel 4.2. Karakteristik Isolat BAL dari Usus Ikan Puyau

Karakteristik	P1	P2	P3	P4	P5
Bentuk koloni	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat
Warna	Putih susu	Putih	Putih susu	Putih	Putih susu
Elevasi	Cembung	Cembung	Cembung	Cembung	Cembung
Pinggiran	Halus	Halus	Halus	Halus	Halus
Bentuk sel	Coccus	Coccus	Bacillus	Coccus	Coccus
Pengaturan sel	Diplococcus	Streptococcus	Diplobacillus	Streptococcus	Streptococcus
Pewarnaan gram	+	+	+	+	+
Motilitas	-	+	-	+	-
Katalase	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+
Metil-red	+	-	+	-	+
Produksi asam dari karbohidrat					
Glukosa	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+
Sukrosa	+	+	+	+	+
Laktosa	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	+	-	+
Mannitol	-	-	+	-	+
Produksi H ₂ S	-	-	-	-	-
Produksi gas	-	-	-	-	-
Genus	<i>Lactococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>

2. Sensitivitas Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan terhadap Antibiotik

Seluruh isolat bakteri yang diperoleh pada uji sebelumnya kemudian diuji sensitivitasnya terhadap beberapa antibiotik komersial. Hal ini dilakukan agar nanti BAL sebagai probiotik bisa diaplikasikan bersama dengan antibiotik jika memang diperlukan dalam upaya pengendalian penyakit bakterial pada ikan budidaya. Sensitivitas isolat BAL dari usus ikan repang dan puyau dapat dilihat pada Tabel 4.3. Berdasarkan Mayer (2007), sensitivitas isolat bakteri terhadap antibiotik dikategorikan menjadi tiga kelompok, tergantung pada daya hambatnya. Diameter zona hambat sebesar 13 mm sebagai resisten, pada 14-18 mm sebagai intermediat dan pada 19 mm sebagai rentan atau sensitif. Sepuluh isolat BAL dari usus kedua ikan ini termasuk dalam ketiga kategori tersebut, dengan kisaran zona hambat 9,3-25,0 mm.

Tabel 4.3. Sensitivitas Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan

Isolat BAL	CIP	NOR	C	CN	NA	OT
R1	R	I	I	S	R	R
R2	R	S	R	I	R	R
R3	S	S	S	S	R	R
R4	S	S	S	S	R	R
R5	S	I	S	I	R	R
P1	S	S	R	I	R	R
P2	S	I	R	I	R	R
P3	S	I	S	I	R	R
P4	S	I	R	I	R	R
P5	S	R	R	I	R	R

CIP-Ciprofloxacin (10 mcg); NOR-Norfloxacin (10 mcg); C-Chloramphenicol (30 mcg); CN-Gentamycin (10 mcg); NA-Nalidixic Acid (30 mcg); OT-Oxytetracycline (30 mcg); R-Resisten; I-Intermediat, S-Sensitif.

3. Aktivitas Antibakterial Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan terhadap Patogen

Aktivitas antibakterial atau sensitive terhadap sepuluh isolat BAL diuji kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan dua bakteri patogen, yaitu: *A. hydrophila*, dan *Pseudomonas* sp. (Tabel 4.4). Diameter zona bening semua isolat BAL terhadap ketiga patogen berkisar antara 10.0 hingga 15.3 mm. Aktivitas antibakterial yang dapat menghasilkan zona sensitive 10,0 hingga 20,0 mm tergolong dalam kategori kuat (Davis & Stout 1971).

Tabel 4.4. Diameter Zona Hambat Isolat BAL terhadap Patogen (mm)

Isolat BAL	<i>A. hydrophila</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
R1	11.7	10.0
R2	12.3	13.7
R3	12.0	11.7
R4	11.0	12.7
R5	15.3	12.3
P1	12.7	11.7
P2	13.3	11.0
P3	14.3	14.3
P4	11.0	11.7
P5	10.0	12.0

Isolat bakteri R5 menunjukkan ukuran zona hambat terbesar terhadap *A. hydrophila* yaitu sebesar 15.3 mm, isolat R4 dan P4 menunjukkan zona hambat terkecil yaitu sebesar 11.00 mm. Zona hambat terbesar terhadap *Pseudomonas* sp., sebesar 14.3 mm, isolat R1 menunjukkan zona hambat terkecil, yaitu 10.0 mm. Daya hambat atau aktivitas antibakteri terbesar terhadap kedua bakteri patogen

tersebut ditunjukkan oleh isolat R5 dengan zona hambat 15.3 mm, disusul P3 sebesar 14.3 mm dan R2 sebesar 13.7 mm.

4. Toleransi Isolat Bakteri Asam Laktat terhadap pH, Garam empedu dan NaCl dalam Media Tumbuhnya

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sepuluh isolat BAL dari usus ikan repang dan ikan puyau masih dapat hidup pada media dengan pH asam basa (pH 2-8). Toleransi meningkat dengan meningkatnya kadar pH. Toleransi isolat BAL dari usus ikan juga ditunjukkan pada kadar garam empedu 1-3%. Toleransi sepuluh isolat BAL dari usus ikan terhadap kadar garam (NaCl) sebesar 3-7% ditunjukkan oleh pertumbuhan bakteri, meskipun menurun dengan meningkatnya kadar NaCl (Tabel 4.5).

Tabel 4.5. Nilai Optical Density (OD) Isolat BAL pada Media dengan pH, Kadar Garam Empedu dan NaCl yang Berbeda

Isolat BAL	pH			Garam Empedu			NaCl		
	pH 2	pH 4	pH 8	1%	2%	3%	3%	5%	7%
R1	0.08	0.76	0.93	0.82	0.92	0.93	1.41	1.38	0.90
R2	0.12	0.37	1.01	0.80	0.87	0.90	0.66	0.49	0.09
R3	0.11	0.28	0.96	0.78	0.89	0.93	1.47	1.37	0.52
R4	0.11	0.18	0.93	0.82	0.91	0.93	1.32	1.23	0.32
R5	0.09	0.20	0.90	0.71	0.73	0.82	1.48	1.34	0.53
P1	0.03	1.07	1.56	1.37	1.42	1.46	1.49	1.29	0.15
P2	0.05	0.3	0.80	0.87	0.88	0.91	1.32	1.27	0.40
P3	0.07	1.06	1.54	1.37	1.46	1.48	1.47	1.32	0.28
P4	0.05	1.07	1.54	1.46	1.43	1.50	1.44	1.33	0.26
P5	0.08	0.78	1.28	1.24	1.31	1.37	1.51	1.38	0.56

B. Pembahasan

Ketiga jenis BAL ini banyak terdapat pada saluran pencernaan baik ikan air laut maupun ikan air tawar. Feliatra *et al* (2004) menemukan bahwa beberapa bakteri hasil pencernaan ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) mengandung BAL dari genus *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* dan *Lactococcus*. Pada saluran pencernaan ikan bawal bintang (*Trachinotus blochii*), ditemukan isolat

sebagai berikut: B7-P4-K2 dan B8-P4-K1, genus *Lactobacillus*, serta isolat B8-P4-K3 dan 10-P4-K1, tergolong dalam genus *Enterococcus* (Irwansyah *et al*, 2018).

Kumar *et al.* (2013) juga mengisolasi BAL dari genus *Lactobacillus* sp. pada lima ikan air tawar. Hasilnya adalah BAL genus *Lactobacillus* pada semua sampel ikan. Vijayaram *et al.* (2016) juga menemukan beberapa isolat *Lactobacillus* spp. Dalam saluran pencernaan ikan air tawar. Selain itu, Wulandari *et al.* (2015) menemukan jenis BAL yaitu *Bacillus*, *Lactobacillus* dan *Eubacterium*, pada saluran pencernaan ikan lele. Spesies *Lactococcus* telah ditemukan di saluran pencernaan ikan nila (*O. niloticus*) dan dapat memfermentasi limbah industri dan pertanian (Patel *et al*, 2020).

Semua isolat BAL dari usus ikan repang dan puyau resisten terhadap antibiotik Oxytetracycline dan Nalidix acid, sedangkan antibiotik Norfloxin, Chloramphenicol dan Gentamycin tergolong intermediet hingga 28ensitive. Resistensi BAL terhadap antibiotik tergantung pada jenis dan sumber isolatnya (Salminen *et al.* 1998). Resistensi isolat bakteri probiotik sangat membantu dalam aplikasi bersamaan dengan antibiotik pada media kultur. Bakteri ini akan bertahan lama di saluran pencernaan ikan dan tidak terpengaruh oleh terapi dengan antibiotik. Namun, beberapa isolat BAL dari usus ikan juga ditemukan 28ensitive terhadap beberapa jenis antibiotik (Hanol *et al.* 2020). Ikan repang dan puyau yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan liar yang memiliki kemungkinan kecil terkena bahan kimia atau antibiotik, sehingga wajar jika ditemukan isolat dari ususnya yang 28ensitive terhadap antibiotik. Hal ini sejalan dengan penelitian Agustina *et al.* (2018) tentang *O. melanopleurus*.

Hanol *et al.* (2020) menemukan 25 isolat BAL pada beberapa ikan air tawar yang dapat menghambat bakteri patogen dengan kisaran zona hambat lemah hingga sangat kuat. Isolat terbaik selanjutnya diidentifikasi sebagai bakteri dari genus *Lactobacillus* dan *Lactococcus*. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan pada kedua ikan lokal ini, genus *Lactococcus*, *Enterococcus* dan *Lactobacillus* yang menunjukkan aktivitas antibakteri dalam kisaran yang kuat. Ada

49 isolat BAL dari usus ikan guppy (*Poecilia reticulata*) juga menunjukkan aktivitas antibakterial yang kuat setelah diuji dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) secara *in vitro* (Jahangiri *et al.* 2018). Uji *in vitro* pada isolat BAL dari usus dan insang ikan nila sejalan dengan penelitian ini, menunjukkan kemampuan antibakteri BAL *Enterococcus faecalis* terhadap beberapa patogen pada ikan (Prachom *et al.* 2020).

Uji kemampuannya untuk hidup dan tumbuh di dalam media dengan pH asam sampai basa terkait dengan kemampuan BAL untuk hidup dan berkembang di saluran pencernaan ikan. Hal ini mengikuti aplikasi probiotik, mengingat kondisi asam di perut ikan. Kriteria penting untuk memilih BAL sebagai probiotik adalah potensi viabilitasnya pada pH rendah (Kim dan Austin, 2008). Hal ini sejalan dengan temuan Vijayaram *et al.* (2016) bahwa isolat bakteri dari beberapa jenis ikan air tawar dapat hidup pada pH 2-4,5 selama inkubasi 24 jam. Sebaliknya, Allameh *et al.* (2012) menemukan bahwa isolat BAL dari usus ikan gabus tidak dapat hidup pada pH 2 tetapi pada pH 3-8 dengan masa inkubasi 2 jam. Hal ini juga dilaporkan oleh Jahangiri *et al.* (2018) yang menemukan bahwa inkubasi selama 2 jam tidak menunjukkan adanya pertumbuhan BAL pada pH 2.5.

Hasil penelitian ini sesuai dengan Patel *et al.* (2020) yang menunjukkan bahwa isolat BAL (*Lactococcus garviae*) dapat hidup pada kisaran kadar garam 3-7%, hanya menurun pada kadar garam 7%. NaCl merupakan zat yang dapat menghambat pertumbuhan beberapa jenis bakteri. Pada penelitian ini, isolat BAL yang masih mampu hidup pada kadar garam 7% menunjukkan bahwa bakteri tersebut ideal sebagai kandidat probiotik. Hasil ini sejalan dengan yang ditemukan oleh Prachom *et al.* (2020), yang menguji isolat BAL dalam empedu segar. Dalam interval konsentrasi 0-10%, bakteri masih tumbuh dengan baik hingga tingkat empedu 8% dan kemudian menurun. Beberapa penelitian melaporkan bahwa probiotik harus bertahan atau resisten terhadap zat yang menghambat pertumbuhannya di saluran pencernaan, seperti garam empedu (Allameh *et al.* 2012; Prabhurajeshwar dan Chandrakanth 2017).

BAB V.

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari penelitian Penapisan Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Air Tawar ini maka dapat disimpulkan beberapa hal di bawah ini:

1. Pada usus ikan repang dan ikan puyau telah diisolasi sepuluh isolat bakteri asam laktat dan berdasarkan karakteristik biokimiawi diidentifikasi sebagai bakteri *Lactococcus* sp., *Enterococcus* sp. dan *Lactobacillus* sp.
2. Isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau bersifat resisten terhadap beberapa antibiotik sehingga berpotensi diaplikasikan secara bersamaan dengan antibiotik jika memang diperlukan.
3. Isolat bakteri asam laktat memiliki kemampuan menghambat bakteri patogen *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. secara *in vitro* dengan kategori kuat.
4. Isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dan puyau memiliki toleransi terhadap media dengan pH, kadar garam empedu dan kadar NaCl yang berbeda sehingga memiliki potensi sebagai kandidat probiotik yang potensial dalam budidaya ikan air tawar.

B. Saran

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, maka saran yang dapat diberikan adalah:

1. Perlu penelitian lanjutan mengenai potensi bakteri asam laktat secara *in vivo* sebagai kandidat probiotik pada ikan.
2. Penelitian mengenai ikan lokal menjadi perlu dilakukan mengingat potensi yang bisa dikembangkan di masa yang akan datang dalam budidaya ikan, khususnya ikan air tawar.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelhamed, H., I. Ibrahim, W. Baumgartner, M.L. Lawrence and A. Karsi. 2017. Characterization of Histopathological and Ultrastructural Changes in Channel Catfish Experimentally Infected with Virulent *Aeromonas hydrophila*. *Frontiers in Microbiology Article* 1519 (8): 1-15.
- Aekanurmaningdyah, A. and Kurniasih. 2018. Pathogenecity of *Pseudomonas anguilliseptica* Infection in Goldfish (*Cyprinus Carpio*). *International Journal of Cell Science & Molecular Biology* 4(5): 111-116.
- Agustina, C. A. Pebrianto, M. Ma'ruf, A. Susanto dan M. Jannah. 2014. Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. pada Ikan yang Dibudidayakan dalam Karamba di Danau Melintang dan Sungai Mahakam Kabupaten Kutai Kartanegara Kalimantan Timur. *Prosiding Seminar Nasional Tahunan XI Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan: 30 Agustus 2014, Yogyakarta*.
- Alakomi, H. L., E. Skyttä, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala, and I.M. Helander. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2001–2005.
- Amin, M., M. Adams, C.J.S. Bolch, C.M. Burke. 2016. In vitro screening of lactic acid bacteria isolated from gastrointestinal tract of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) as probiont candidates. *Aquac. Int.* 23:1-14.
- Angka, S.L. 2005. Kajian Penyakit Motile Aromonad Septicemia (MAS) pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp.): Patologi, Pencegahan dan Pengobatannya dengan Fitofarmaka. (Disertasi). Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Benson. 2001. *Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology. Eighth Edition.* McGraw-Hill Science Company. New York. pp. 72-175.
- Davis, W.W., dan T.R. Stout. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. *Appl. Microbiol.* 22(4): 659-665.
- De Vuyst, L., and F. Leroy. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13, 194-199.
- El-Atta, M.E.A. and M.M. El. Tantawy. 2008. Bacterial Causes of Skin Ulcers Affection in Tilapia Nilotica (*Oreochromis niloticus*) with Special References to Its Control. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture 1419-1436.
- Elayaraja, S., N. Annamalai, P. Mayavu, and T. Balasubramanian. 2014. Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus*

- AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4, S305–S311.
- Fossi, B.T., F. Tavea, and R. Ndjouenkeu. 2005. Production and Partial Characterization Thermostable Amilase from Ascomycetes Yeast Strain Isolated from Starchy Soils. *African Journal of Biotechnology* 4(1): 14-18.
- Gómez-Sala, B. E. Muñoz-Atienza, J. Sánchez, A. Basanta, C. Herranz, P. E. Hernández, and L. Cintas. 2015. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. *Eur Food Res Technol.* DOI 10.1007/s00217-015-2465-3.
- Hanol. B.Z, F.B. Ucar, B. Giray. 2020. Identification and probiotic properties of lactic acid bacterial isolated from freshwater fish. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* (4)19: 1795-1807.
- Hardi, E.H. 2012. Bacteria Levels Difference Pathogenicity *Aeromonas* sp. and *Pseudomonas* sp. on Tilapia. Proceeding The International Symposium on Human Development and Sustainable Utilization of Natural Resources in Asian Countries (ISBN: 978-602-98400-1-8). Balikpapan, 9-12 Juli 2012.
- Hardi, E.H., C.A. Pebrianto dan G. Saptiani. 2014. Toksisitas Produk Ekstraseluler dan Intraseluler Bakteri *Pseudomonas* sp. pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Veteriner* 15 (3): 312-322.
- Hasanah, U. 2014. Bakteri Asam Laktat dari Daging Ikan Peda Sebagai Agen Probiotik dan Enzim Kolesterol Reduktase. *Jurnal Keluarga Sehat Sejahtera.* 12(23):1-8.
- Hoseinifar, S. H., M. Khalili, and Y.-Z. Sun. 2016. Intestinal histomorphology, autochthonous microbiota and growth performance of the Oscar (*Astronotus ocellatus* Agassiz, 1831) following dietary administration of xylooligosaccharide. *J. Ichthyol.* 32: 1137-1141.
- Hawke, J.P., A.C. McWhorter, A.G. Steigerwait, and D.J. Brenner. 1981. *Edwardsiella ictaluri*, the causative agent of enteric septicaemia of catfish. *Int.J. Syst. Bacteriol.* 31: 396-400.
- Holt J. G., N. R. Krieg., P. H. A. Sneath, J. T. S. T. Stanley, William. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* (ed), William Wilkins, Baltimore.
- Hossain, M.M., and B.R. Chowdhury. 2009. *Pseudomonas anguilliseptica* as A Pathogen of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Culture in Bangladesh. *Bangladesh Research Publications Journal* 2(4): 712-721.
- Ibrahem, M.D., M.M. Mostafa, R.M.H. Arab, and M.A. Rezk. 2008. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* Infection in Wild and Cultured Tilapia Nilotica (*O. niloticus*) in Egypt. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 1257-1271.

- Janurianda, F.V., B. Hardigaluh, Yokhebed. 2013. Inventarisasi Ikan Hasil Tangkapan Nelayan Di Danau Bekat Dan Implementasinya Pembuatan Buklet Keanekaragaman Jenis. <https://jurnal.untan.ac.id>
- Kaban. S., Asyari, F. Supriyadi, Burnawi, D. H. Nasution dan S. Argawi. 2016. Identifikasi Karakteristik Habitat, Potensi dan Ikan Dominan untuk Pengelolaan Perikanan di Sungai Batanghari, Jambi. Balai Penelitian Perikanan Perairan Umum Palembang, Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan. Badan Penelitian dan Pengembangan Kelautan dan Perikanan. Kementerian Kelautan dan Perikanan. 79 hlm.
- Keskin, O., Secer, S., Izgur, M., Turkyilmaz, S., and Mkakosya, R.S. (2004). *Edwardsiella ictaluri* Infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk. Journal Veterinary Animal Science*, 28, 649-653.
- Khatun, H., M.D. Hossain, S.N. Jahan and D.A. Khanom. 2011. Bacterial Infestation in Different Fish at Rajshahi. *J. Sci. Foundation* 9 (1&2): 77-84.
- Kottelat, M., J.A. Whitten, S.N. Kartikasari, dan S. Wirjoatmodjo. 1993. *Freshwater Fishes of Western Indonesia and Sulawesi*. Periplus Edition (HK) Ltd. Hongkong. 377 p.
- Kumar, R., S.C. Mukherjee, R. Ranjan and S.K. Nayak. 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immunol.* 24(2): 168-172.
- Kurnia. F., D. Efizon, and R. M. Putra. 2014. Diversity of Fish Species in the Pinang Dalam Lake, Buluh Cina Village, Siak Hulu Sub-Regency, Kampar Regency, Riau Province. *JOM OKTOBER* 2014. 9 p.
- Li, C, R. Wang, B. Su, Y. Luo, J. Terhune, B. Beck and E. Peatman. 2013. Evasion of Mucosal Defenses During *Aeromonas hydrophila* Infection of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Skin. *Dev. Comp. Immunol.* 39: 447-455.
- Liu, Y., Z. Zhou, B. Yao, P. Shi, S. He, L. B. Holvold, and E. Ringo. 2008. Effect of intraperitoneal injection of immunostimulatory substances on allochtonus gut microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) determined using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Aquaculture Research*, 39: 635-646.
- Manshadi, G. and R. Assareh. 2014. Bacterial Study of Fin Rot in Brown Trout by API20E. *Pakistan Journal of Biological Science* 17 (3): 434-438.
- Mayer, G. 2007. *Medical Microbiology and Immunology*. Univ. Of South Carolina School of Medicine. 3^{ed}. Microbiology and Immunology On-Line Textbook.
- Melliawati, R., Djohan, A.C., & Yopi. (2015). Seleksi Bakteri Asam Laktat Sebagai Penghasil Enzim Protease. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 1 (2): 184-188.

- Mukherjee, A., D. Dutta, S. Banerjee, E. Ringø, E.M. Breines, and E. Hareide. 2016. Potential probiotics from Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. Characterization, pathogen inhibitory activity, partial characterization of bacteriocin and production of exoenzymes. *Res. Vet. Sci.* 108:76-84.
- Mulyanti. P. 2020. Identifikasi Jenis Ikan Endemik Dan Invasif Di Desa Sungai Rambut Kecamatan Berbak Kabupaten Tanjung Jabung Timur. Program Studi Tadris Biologi Fakultas Tarbiyah Dan Keguruan Universitas Islam Negeri Sulthan Thaha Saifuddin Jambi. Skripsi. 94 hlm.
- Nelintong, N., Isnaeni dan Nasution, N. 2015. Aktivitas antibakteri susu probiotik *Lactobacilli* terhadap bakteri penyebab diare (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*). *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 2 (1), 25–30.
- Nespolo, C.R. and A. Brandelli. 2010. Production of Bacteriocin-Like Substances by Lactic Acid Bacteria Isolated from Regional Ovine Cheese. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 1009-1018.
- Noga, E. J. 2010. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. Second Edition. Wiley-Blackwell. John Wiley & Sons, Inc. Iowa, USA. 519 p.
- Panigoro, N., M. Bahnan, E.B. Kholidin and K. Yuasa. 2005. Pathogenicity of *Edwardsiella ictaluri*. [http://www.was.org/meetings/-sessionAbstract.asp? MeetingCode= WA2005 &Session =55– 24k](http://www.was.org/meetings/-sessionAbstract.asp?MeetingCode=WA2005&Session=55-24k) [11-08-2006].
- Patel P., B. Patel, N. Amaresan, B. Joshi, R. Shah, and R. Krishnamurthy. 2020. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from the fish gut for in vitro fermentation with carbohydrates from agro-industrial waste. *Biotechnology Reports* 28: e00555.
- Perez-Sanchez, T., J.L. Balcázar, Y. García, N. Halaihel, D. Vendrell, I. de Blas, D.L. Merrifield, D.L. and I. Ruiz-Zarzuola. 2011. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garviae*. *Journal of Fish Diseases* 34: 499-507.
- Purwaningsih, U., H. Novita dan S. Andriyanto Identifikasi Dan Karakterisasi Bakteri *Edwardsiella Ictaluri* Penyebab Penyakit *Enteric Septicemia Of Catfish* (Esc) Pada Ikan Patin (*Pangasius* sp.). *Jurnal Riset Akuakultur* 14 (1): 47-57.
- Rahmiati dan Mumpuni, M. 2017. Eksplorasi bakteri asam laktat kandidat probiotik dan potensinya dalam menghambat bakteri patogen. *Elkwanie*, 3 (2), 141– 150.

- Ringø, E., Zhou, Z., J. L. Gonzalez Vecino, S. Wadsworth, J. Romero, and Å. Krogdahl. 2016. Effects of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals: a never-ending story? *Aquacult. Nutr.* 22: 219-282.
- Ringø, E., S.H. Hoseinifar, K. Ghosh, H.V. Doan, B. R. Beck and S.K. Song. 2018. Lactic Acid Bacteria in Finfish-An Update . *Frontiers in Microbiology* 9 (01818): 1-37.
- Risna, Y. K., S. Harimurti, Wihandoyo, dan Widodo. Screening for probiotic of lactic acid bacteria isolated from the digestive tract of a native aceh duck (*Anas platyrhynchos*). *Biodiversitas* ISSN: 1412-033x, 21 (7):3001-3007.
- Romadhon, Subagiyo, dan Margino, S. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Usus Udang Penghasil Bakteriosin Sebagai Agen Antibakteria pada Produk-Produk Hasil Perikanan. *Jurnal Saintek Perikanan.* 8(1):59-64.
- Roberts, R.J. 2012. *Fish Pathology*. 4th ed. Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Ltd., Publications. 597 p.
- Saanin, H. 1984. *Taksonomi and Kunci Identifikasi Ikan 1*. Cetakan kedua. Penerbit Bina Cipta. 508 hlm.
- Sahoo, T. K., P. K. Jena, A. K. Patel, and S. Seshadri. 2016. Bacteriocins and their applications for the treatment of bacterial diseases in aquaculture: a review. *Aquacult. Res.* 47: 1013-1027.
- Shao, J.Z., J. Liu and L.X. Xiang. 2004. *Aeromonas hydrophila* Induces Apoptosis in *Carassius auratus* Lymphocytes *In Vitro*. *Aquaculture* 229: 11-23.
- Silva, C. C. G., S.P.M. Silva, and S.C. Riberio. 2018. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Front. Microbiol.* 9:594.
- Song, X., J. Zhao, Y. Bo, Z. Liu, K. Wu and C. Gong. 2014. *Aeromonas hydrophila* Induced Intestinal Inflammation in Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idella*): An Experimental Model. *Aquaculture* 434: 171-178.
- Soto, E., M. Griffin, M. Arauz, A. Riofrio, A. Martinez and M.E. Cabrejos. 2012. *Edwardsiella ictaluri* as the causative agent of mortality in cultured Nile tilapia. *Journal of Aquatic Animal Health* 24: 81-90.
- Strzyzewska, E., J. Szarek and I. Babinska. 2016. Morphological Evaluation of The Gills as a Tool in The Diagnostics of Pathological Conditions in Fish and Pollution in The Aquatic Environment: a review. *Veterinary Medicine* 61(3): 123-132.
- Sunaryanto, R., Martius, E. dan Marwoto, B. 2014. Uji kemampuan *Lactobacillus casei* sebagai agensia probiotik. *Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 1 (1), 9–14.

- Utomo, A.D., S. Adjie, S.N. Aida dan K. Fatah. 2010. Potensi Sumber Daya ikan di Daerah Aliran Sungai Musi, Sumatera Selatan. Buku Perikanan Perairan Sungai Musi Sumatera Selatan. Balai Riset Perikanan Perairan Umum. Pusat Penelitian Pengelolaan Perikanan Dan Konservasi Sumberdaya Ikan. Hal. 99-206.
- Waltman, W.D., E.B. Shotts, and T.C. Hsu. 1986. Biochemical characteristics of *Edwardsiella ictaluri*. *Applied and Environmental Microbiology* 51(1), 101-104.
- Zapata, A.A. and M. Lara-Flores. 2013. Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Nile Tilapia Intestine (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Biology and Life Science* ISSN 2157-6076, (4) 1: 164-171.