

LAPORAN PENELITIAN

PENAPISAN BAKTERI POTENSIAL PROBIOTIK 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**

2020

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Penapisan Bakteri Potensial Probiotik 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. 2.000.000,- (Dua juta rupiah)
Sumber Dana Penelitian : Mandiri

Samarinda, 15 November 2020

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 Potensial Probiotik 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, 15 November 2020

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	3
C. Tujuan.....	4
D. Manfaat.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Klasifikasi dan Morfologi ikan mas (<i>Cyprinus carpio</i>).....	5
B. Klasifikasi dan Morfologi Ikan Lele (<i>Clarias Batrachus</i>)	6
C. Bakteri Patogen pada Ikan Air Tawar	9
D. Peranan Bakteri sebagai Mikrobiota Saluran Pencernaan Ikan	11
E. Probiotik	15
F. Kriteria Bakteri Probiotik	16
G. Mekanisme Kerja Bakteri Probiotik	17
BAB III. METODE PENELITIAN	20
A. Waktu dan tempat	20
B. Alat dan bahan	20
C. Prosedur Penelitian	21
1. Pengambilan Sampel.....	21
2. Isolasi Bakteri Probiotik	21
3. Tahap Pemurnian Kultur Bakteri.....	21
4. Pembuatan Stok Bakteri	21
5. Karakterisasi Bakteri Probiotik.....	21

6. Uji daya hambat bakteri usus secara in vitro terhadap bakteri	
<i>A. hydrophila</i>	22
7. Uji Biokimiawi	22
8. Uji Daya Patogenitas bakteri usus	25
9. Uji daya hambat secara <i>in vivo</i> dan pertumbuhan ikan	25
D. Pengumpulan dan Analisis Data.....	26
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
A. Hasil	27
1. Isolasi dan Pemurnian Bakteri.....	27
2. Uji Penghambatan Bakteri terhadap <i>A. hydrophila</i> secara <i>In Vitro</i>	28
3. Uji Patogenitas Bakteri Usus	30
4. Identifikasi Lima Isolat dari Usus Ikan Lele dan Mas secara Biokimiawi...	31
5. Uji Penghambatan Bakteri Usus terhadap <i>A. hydrophila</i> secara <i>In Vivo</i> ..	32
6. Pertumbuhan Ikan Lele dan Mas dengan Pemberian Isolat Bakteri Usus	34
B. Pembahasan	34
BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN	40
A. Kesimpulan	40
B. Saran.....	40
DAFTAR PUSTAKA	41

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4. 1. Kode dan morfologi isolat bakteri yang berasal dari usus ikan lele..	27
Tabel 4. 2. Kode dan morfologi isolat bakteri yang berasal dari usus ikan mas .	28
Tabel 4. 3. Isolat bakteri hasil isolasi dan luas zona hambat (mm)	29
Tabel 4. 4. Karakteristik Biokimiawi Lima Isolat dari Usus Ikan Lele dan Mas....	31
Tabel 4. 5. Jumlah Bakteri <i>A. hydrophila</i> dalam Darah Ikan Lele dan Ikan Mas	33

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2. 1. Morfologi Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	6
Gambar 2. 2. Morfologi Ikan Lele (<i>Clarias batrachus</i>)	7
Gambar 4. 1. Zona hambat yang dihasilkan pada uji <i>in vitro</i>	29
Gambar 4. 2. Tingkat kelangsungan hidup ikan lele dan mas pada uji patogenitas bakteri usus.....	31
Gambar 4. 3. Tingkat kelangsungan hidup ikan lele dan mas pada uji daya hambat bakteri usus secara <i>in vivo</i>	32
Gambar 4. 4. Pertumbuhan ikan lele dengan pemberian bakteri usus.....	34
Gambar 4. 5. Pertumbuhan ikan mas dengan pemberian bakteri usus	35

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Seiring dengan meningkatnya jumlah penduduk yang diimbangi dengan kesadaran pentingnya kandungan protein yang terkandung pada ikan, maka permintaan produk akan perikanan semakin meningkat. Salah satu produk perikanan air tawar yang mempunyai permintaan pasar yang luas adalah ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan ikan lele (*Clarias batrachus*). Ikan Mas (*C. carpio*) dan ikan lele (*C. batrachus*) merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang mempunyai nilai ekonomi tinggi karena sangat digemari baik di dalam maupun di luar negeri. Permintaan pasar yang terus menerus meningkat, memberikan peluang bagi Indonesia untuk meningkatkan produksinya. Dalam upaya memenuhi permintaan pasar, maka perlu dilakukan upaya budidaya secara intensif, namun dalam budidaya secara intensif sering dihadapkan pada beberapa kendala. Kendala terbesar yang selalu dihadapi pada kegiatan budidaya adalah terjadinya serangan bakteri patogen terutama pada stadia larva.

Serangan bakteri patogen ini menimbulkan penurunan kualitas dan tingkat produksi pada usaha pembenihan ikan, bahkan kematian dan kegagalan panen dapat terjadi. Penyakit bakterial yang sering menyerang ikan budidaya di daerah ini adalah bakteri *A. hydrophila* yang bisa menyerang ikan di semua stadia umur. *A. hydrophila* merupakan bakteri fakultatif yang bisa menginfeksi ikan saat ikan dalam keadaan stress akibat menurunnya kualitas air di lingkungan budidaya (Noga, 2010). Berdasarkan penelitian Agustina *dkk.* (2014), bakteri *A. hydrophila* ditemukan pada ikan yang sehat maupun ikan yang sakit.

Salah satu metode pencegahan penyakit ikan yang sangat populer saat ini adalah penggunaan probiotik, yang merupakan prosedur yang sangat baik dalam mencegah penyakit infeksi dan sebagai alternatif untuk penggunaan antibiotik dan bahan-bahan kimia lain (Watson *et al.*, 2008; Hagi dan Hashino, 2009;

Muthukumar dan Kandeepan, 2015). Probiotik merupakan alternatif terhadap penggunaan antibiotik yang sudah sangat lama menjadi prosedur pengobatan utama untuk mengobati berbagai penyakit infeksi (Sornplang, 2016). Penggunaan istilah suplemen makanan/ mikroba makanan pertama kali diperkenalkan oleh Parker, dimana dia mendefinisikan probiotik sebagai organisme atau zat yang berkontribusi terhadap keseimbangan mikroba usus (Parker, 1974 dalam Cruz et al., 2012). Watson *et al.*, (2008) mendefinisikan probiotik sebagai mikroorganisme hidup yang apabila diberikan pada hewan, manusia atau ikan dapat mempengaruhi inang dengan cara memperbaiki properti mikroflora indigenous dari inang atau lingkungan. Menurut, Nayak (2010) probiotik sebagai agen mikrob hidup yang memberikan keuntungan terhadap inangnya dengan cara memodifikasi komunitas mikroba atau berasosiasi dengan inangnya, meningkatkan respons terhadap penyakit, memperbaiki nutrisi, dan pemanfaatan pakan. Pernyataan ini didukung dengan beberapa penelitian yang dilakukan dimana hasil yang diperoleh probiotik dapat meningkatkan efisiensi pakan serta meningkatkan imun nonspesifik pada ikan. Penggunaan probiotik dalam akuakultur saat ini semakin meningkat sejalan dengan meningkatnya kebutuhan pengembangan budidaya ramah lingkungan (Akter *et al.*, 2016). Dengan pemberian probiotik, ikan dapat mencapai pertumbuhan optimal dan meningkatkan imunitas terhadap penyakit (Utami *et al.*, 2015; Talpur *et al.*, 2014, Sukenda *et al.*, 2016).

Dalam meningkatkan kinerja pertumbuhan, mekanisme kerja bakteri probiotik yaitu dengan menghasilkan enzim-enzim yang dapat membantu proses pencernaan disaluran pencernaan ikan. Peningkatan kinerja pertumbuhan dapat terjadi karena adanya bakteri dalam saluran pencernaan ikan yang dapat menghasilkan enzim pencernaan eksogen dimana bakteri ini mempunyai aktivitas amilolitik (mencerna karbohidrat), proteolitik (mencerna protein), dan lipolitik (mencerna lemak) (Kurniasi et al., 2013.) Bakteri probiotik memproduksi enzim pencernaan sehingga membantu pemanfaatan dan pencernaan pakan.

Jadi penambahan probiotik dalam pakan ikan meningkatkan performa pertumbuhan yang meliputi pertumbuhan, FCR dan ratio efisiensi protein. Semua ini dihasilkan oleh enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri probiotik yaitu amilase, selulase dan protease. (Watson et al, 2008) Banyak penelitian juga yang sudah dilakukan untuk mendapatkan jenis-jenis probiotik yang baru untuk akuakultur dan diisolasi dari berbagai organisme akuatik (Sukenda, et al., 2005; Sunarto et.al., 2010; Mulyati, 2010; Muthukumar dan Kandeepan, 2015).

Probiotik umumnya diisolasi dari sistem pencernaan, dan medium hidup organisme kultur, dan ditargetkan untuk diaplikasikan pada medium kultur jenis organisme yang sama. Sebagai contoh Sunarto *et al.*, (2010) melakukan penapisan bakteri probiotik dari saluran pencernaan dan media pemeliharaan ikan jelawat (*Leptobarbus hoeveni Bleker*); Sukenda, et al., (2005) menapis bakteri probiotik dari medium air kultur udang vaname (*Litopenaeus vannamei*), untuk menghambat infeksi *Vibrio harveyi* pada budidaya udang vanname. Berdasarkan hal tersebut di atas, maka penulis merasa perlu untuk melakukan penelitian mengenai potensi usus ikan lele dan mas sebagai probiotik bagi ikan air tawar, khususnya ikan budidaya.

B. Rumusan Masalah

Salah satu metode pencegahan penyakit ikan yang sangat populer saat ini adalah penggunaan probiotik, yang merupakan prosedur yang sangat baik dalam mencegah penyakit infeksi dan sebagai alternatif untuk penggunaan antibiotik dan bahan-bahan kimia lain. Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk menjawab beberapa hal sebagai berikut:

1. Apakah ada jenis bakteri usus ikan lele dan mas yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* sp. secara *in vitro*?
2. Apakah bakteri dari usus ikan lele dan ikan mas yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro* aman bagi ikan tersebut?

3. Apakah ada jenis bakteri usus ikan lele dan mas yang mampu secara *in vivo* dan mampu meningkatkan pertumbuhan ikan tersebut

C. Tujuan

Penelitian ‘Penapisan bakteri potensial probiotik dari usus ikan lele (*Clarias batrachus*) dan mas (*Cyprinus carpio*)’ dilaksanakan dengan tujuan sebagai berikut:

1. Menganalisis dan menemukan bakteri usus ikan lele dan mas yang bersifat antibakterial terhadap bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. secara *in vitro*
2. Menganalisis dan menemukan bakteri usus ikan lele dan mas yang tidak patogen bagi ikan tersebut
3. Menganalisis dan menemukan bakteri usus ikan lele dan mas yang mampu diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* secara *in vivo* dan mampu meningkatkan pertumbuhan ikan tersebut.

D. Manfaat

Penelitian ‘Penapisan bakteri potensial probiotik dari usus ikan lele dan mas’ diharapkan dapat memberikan manfaat antara lain:

1. Dapat memberi informasi mengenai jenis bakteri dari usus ikan lele dan mas yang memiliki aktivitas antibakterial secara *in vitro*.
2. Temuan baru yang diperoleh dari penelitian ini juga dapat dijadikan sebagai informasi dan acuan atau *state of the art* bagi kegiatan-kegiatan penelitian selanjutnya berkaitan dengan upaya pengelolaan kesehatan ikan khususnya di bidang budidaya.
3. Memberikan manfaat bagi masyarakat dan dunia usaha dalam pengembangan dan pemanfaatan produk berupa bakteri probiotik yang berasal dari usus ikan lele dan mas.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Klasifikasi dan Morfologi ikan mas (*Cyprinus carpio*)

Ikan mas merupakan jenis ikan konsumsi air tawar, memiliki badan dengan bentuk panjang dan pipih kesamping serta memiliki daging yang lunak. Ikan mas sendiri sudah dipelihara sejak tahun 475 sebelum masehi di Cina sedangkan di Indonesia, ikan mas dipelihara sekitar tahun 1920. Ikan mas yang terdapat di Indonesia merupakan merupakan jenis ikan mas yang dibawa dari Cina, Eropa, Taiwan dan Jepang. Hingga saat ini sudah terdapat 10 jenis ikan mas yang telah diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologisnya. Klasifikasi ikan mas adalah sebagai berikut (Bachtiar 2002) :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Osteichthyes
Subkelas	: Actinopterygii
Ordo	: Cypriniformes
Subordo	: Cyprinoidea
Famili	: Cyprinidae
Subfamili	: Cyprininae
Genus	: <i>Cyprinus</i>
Spesies	: <i>Cyprinus carpio</i>



Gambar 2.1. Morfologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Saat ini ikan mas mempunyai banyak ras atau strain. Perbedaan sifat dan ciri dari ras disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya adalah adanya interaksi antara genotipe dan lingkungan kolam, musim dan cara pemeliharaan. Perbedaan tersebut dapat dilihat dari penampilan bentuk fisik, bentuk tubuh dan warnanya. Ikan mas memiliki bentuk tubuh yang agak memanjang dan sedikit memipih ke samping (compressed). Sebagian besar tubuh ikan mas ditutupi oleh sisik. Moncongnya terletak di ujung tengah (terminal) dan dapat disembulkan (protaktil). Pada bibirnya yang lunak terdapat dua pasang sungut (berbel) dan tidak bergerigi. Pada bagian dalam mulut terdapat gigi kerongkongan (pharyngeal teeth) sebanyak tiga baris berbentuk geraham. Sirip punggung ikan mas memanjang dan bagian permukaannya terletak berseberangan dengan permukaan sirip perut (ventral). Sirip punggungnya (dorsal) berjari-jari keras, sedangkan di bagian akhir bergerigi. Seperti halnya sirip punggung, bagian belakang sirip dubur (anal) ikan mas ini pun berjari-jari keras dan bergerigi pada ujungnya. Sirip ekornya menyerupai cagak memanjang simetris hingga ke belakang tutup insang, sisik ikan mas relatif besar dengan tipe sisik lingkaran (cycloid) yang terletak beraturan. Garis rusuk atau gurat sisi (linea lateralis) yang lengkap terletak di tengah tubuh dengan posisi melintang dari tutup insang sampai ke ujung belakang pangkal ekor (Bachtiar 2002).

B. Klasifikasi dan Morfologi Ikan Lele (*Clarias Batrachus*)

Ikan lele adalah salah satu jenis ikan air tawar yang termasuk ke dalam ordo Siluriformes dan digolongkan ke dalam ikan bertulang sejati. Jenis ikan lele jawa (*Clarias batrachus*) juga dalam tingkatan produktifitasnya sangat tinggi yang sudah dibudidayakan secara luas di negara Indonesia ini. Teknologi yang digunakan juga sudah pada tingkatan cukup tinggi.



Gambar 2.2. Morfologi ikan lele (*Clarias batrachus*)

Klasifikasi ikan lele berdasarkan Saanin (1984) dalam Hilwa (2004) yaitu sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Pisces
Subkelas : Teleostei
Ordo : Ostarophysi
Subordo : Siluroidae
Famili : Clariidae
Genus : *Clarias*
Species : *Clarias batrachus*

Ikan lele memiliki alat pernafasan tambahan (arborescent organ) yang terletak di bagian depan rongga insang, yang memungkinkan ikan untuk mengambil oksigen langsung dari udara. Alat pernafasan ini berwarna kemerahan dan berbentuk seperti tajuk pohon rimbun yang penuh kapiler-kapiler darah. Oleh karena itu, ikan lele dapat hidup dalam kondisi perairan yang mengandung sedikit kadar oksigen (Suyanto, 2000). Sebagai alat bantu renang, lele memiliki tiga buah sirip tunggal yaitu sirip punggung, sirip ekor, sirip dubur. Lele juga memiliki sirip berpasangan yaitu sirip dada dan sirip perut. Sirip dada dilengkapi dengan sirip yang keras dan runcing yang disebut dengan patil. Patil

ini berguna sebagai senjata dan alat bantu untuk bergerak (Khairuman dan Amri, 2002 dalam Fitriah 2004).

Morfologi ikan lele (*Clarias batrachus*) menurut dari Puspowardoyo dan Djarijah, 2002 mengatakan bahwa ikan lele lokal (*Clarias batrachus*) ini memiliki morfologi yang sangat mirip dengan ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). Bentuk tubuh yang memanjang, bulat, kepala yang agak melebar, tidak memiliki sisik, memiliki kulit yang licin, warna kulit terdapat bercak – bercak berwarna keputihan hingga kecoklatan abu-abu. Tengah badannya mempunyai potongan membulat, dengan kepala pipih kebawah (depressed), sedangkan bagian belakang tubuhnya berbentuk pipih kesamping (compressed), jadi lele ditemukan tiga bentuk potongan melintang (pipih ke bawah, bulat dan pipih ke samping). Kepala bagian atas dan bawah tertutup oleh pelat tulang. Pelat ini membentuk ruangan rongga diatas insang. Disinilah terdapat alat pernapasan tambahan yang tergabung dengan busur insang kedua dan keempat. Mulut berada diujung moncong (terminal), dengan dihiasi 4 pasang sungut. Lubang hidung yang depan merupakan tabung pendek berada dibelakang bibir atas, lubang hidung sebelah belakang merupakan celah yang kurang lebih bundar berada di belakang sungut nasal. Mata berbentuk kecil dengan tepi orbital yang bebas. Sirip ekor membulat, tidak bergabung dengan sirip punggung maupun sirip anal. Sirip perut berbentuk membulat dan panjangnya mencapai sirip anal. Sirip dada dilengkapi sepasang duri tajam / patil yang memiliki panjang maksimum mencapai 400 mm. Patil ini beracun terutama pada ikan ikan remaja, sedangkan pada ikan yang tua sudah agak berkurang racunya. Ikan ini memiliki kulit berlendir dan tidak bersisik (mempunyai pigmen hitam yang berubah menjadi pucat bila terkena cahaya matahari. Dua lubang penciuman yang terletak di belakang bibir atas, sirip punggung dan dubur memanjang sampai ke pangkal ekor namun tidak menyatu dengan sirip ekor, panjang maksimum mencapai 400 mm.

C. 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, 2013), dan ikan nila (Ibrahem *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).

D. Peranan Bakteri sebagai Mikrobiota Saluran Pencernaan Ikan

Istilah mikrobiota atau mikroflora umum digunakan untuk menggambarkan komunitas mikroorganisme kompleks yang hidup dalam tubuh organisme dan pengaruh lingkungan sekitar langsung mempengaruhi komunitas ini. Mikroflora sudah mulai ditemukan pada fase awal hidup ikan atau vertebrata lain, tidak merugikan bahkan justru menguntungkan bagi inangnya. Sebagian besar komunitas ini menempati saluran pencernaan ikan dan mempengaruhi sebagian besar proses biologis inang, termasuk perkembangan dan kesehatan organ tersebut (Merrifield dan Ringo, 2014).

Komunitas mikroba dikategorikan dalam dua kelompok besar, yaitu: mikrobiota *allochthonous* dan mikrobiota *autochthonous*. Mikrobiota *allochthonous* merupakan kelompok yang hanya melewati saluran pencernaan bersama makanan sedangkan mikrobiota *autochthonous* adalah kelompok yang memang menetap dalam saluran pencernaan ikan dan mampu berasosiasi dengan jaringan inangnya (Ringo dan Birkbeck, 1999). Menurut Merrifield dan Ringo (2014), jika dibanding mikroorganisme lain seperti virus, archaea, yeast dan protozoa maka bakteri yang hidup di saluran pencernaan ikan banyak dipelajari mengingat perannya yang menguntungkan bagi inang. Peran bakteri pada saluran pencernaan ikan yang menguntungkan tersebut semakin mudah dipelajari dengan ditemukannya teknik sequencing untuk mengamati keberadaannya di saluran pencernaan ikan dan pengaruh lingkungan di sekitarnya (Ghanbari *et al.*, 2015).

Pada penelitian Sharifuzzaman *et al.* (2014) ditemukan bahwa pemberian bakteri dari saluran pencernaan ikan yaitu bakteri *Kocuria* SM1 dan *Rhodococcus* SM2 kondisi usus mengalami peningkatan dibanding usus yang tidak diberi perlakuan kedua bakteri tersebut. Berdasarkan penelitian Izvekova *et al.* (2007),

bakteri yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan air tawar dan laut meliputi kelompok bakteri gram positif dan gram negatif dengan beberapa genus yang banyak ditemukan terdiri dari genus *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, dan *Micrococcus* spp. Beberapa bakteri terlihat berbeda sesuai dengan karakter lingkungannya yaitu air tawar dan air laut. Bakteri anaerobik lebih banyak ditemukan di usus ikan air tawar terutama dari genus *Bacteriodes* spp. dan *Clostridium* spp. Filum yang dominan ditemukan di usus ikan meliputi Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes dan Fusobacteria. Bakteri yang merupakan filum Protobacteria paling dominan diantaranya berkaitan erat dengan kemampuannya memberikan respon-respon penting bagi inangnya. Protobacteria dikenal memiliki kemampuan berproliferasi di dalam saluran pencernaan inang dan lingkungan perairan, sehingga prevalensi kelompok bakteri ini relatif tinggi di saluran pencernaan ikan (Raws *et al.*, 2006; Jami *et al.*, 2015). Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri yang menarik untuk diteliti pada beberapa hewan yang menjadi inangnya. Bakteri asam laktat ini juga ditemukan dalam usus ikan dan memiliki potensi sebagai probiotik pada ikan (Merrifield *et al.*, 2010).

Menurut Ekpo *et al.* (2013), jenis bakteri yang ditemukan di tubuh ikan relatif sama dengan bakteri yang ditemukan di lingkungan perairan baik sedimen maupun air dalam wadah budidayanya. Bakteri *Aeromonas* dan *Streptococcus* ditemukan di air dan ikan, sedangkan *Pseudomonas* dan *Aeromonas* sangat sering ditemukan di beberapa organ ikan yang diuji. Pada sedimen dan usus ikan bakteri yang dominan ditemukan adalah dari genus *Vibrio* dan *Flavobacterium*. Beberapa jenis bakteri yang ada di lingkungan perairan masuk ke dalam saluran pencernaan saat ikan makan, beberapa jenis bakteri yang mampu bertahan terhadap enzim-enzim pencernaan akan menetap dalam usus sedangkan yang lain akan keluar bersama dengan feses. Air masuk melalui operculum ketika ikan bernafas dan insang berperan sebagai filter alami bagi beberapa jenis bakteri yang melekat di insang dan berkembang dengan adanya oksigen dalam jumlah

yang besar di insang. Menurut Pratiwi dan Manan (2015), usus adalah organ yang sering terpapar oleh agen-agen patogen. Agen-agen tersebut masuk ke dalam usus melalui makanan yang masuk ke dalam saluran pencernaan.

Mikrobiota di usus ikan ditemukan semenjak fase awal perkembangan saluran pencernaannya, yaitu ketika saluran pencernaannya masih berbentuk tabung memanjang. Fase awal larva ikan mulai makan makanan dari luar tubuhnya atau saat kuning telur mulai habis maka terjadi perubahan jenis dan jumlah mikroba dalam ususnya. Pada larva ikan salmon (*O. mykiss* Walbaum) awalnya usus didominasi bakteri dari filum Firmicutes sesaat setelah makan pakan dari tumbuhan selanjutnya jenis bakteri yang dominan berupa bakteri *Streptococcus*, *Leuconostoc*, dan *Weisella*, dan filum Proteobacteria pada larva yang makan pakan ikan laut. Hal ini menunjukkan bahwa jenis pakan yang berbeda akan mempengaruhi komposisi mikroba usus ikan (Ingerslev *et al.*, 2014). Hal yang serupa juga ditemukan oleh Revecó *et al.* (2014) bahwa pada ikan salmon Atlantik (*S. salar* L.), kecenderungan jenis bakteri pada ususnya berbeda dengan pemberian pakan yang berbeda, enteritis usus terjadi dengan pemberian pakan berupa tepung kedelai.

Menurut Hai (2015) pemahaman yang lebih baik mengenai model aksi bakteri dari saluran pencernaan ikan sebagai probiotik sangat diperlukan dalam kegiatan akuakultur. Mikrobiota dalam saluran pencernaan hewan memiliki beberapa fungsi yaitu membantu pencernaan atau nutrisi dan perkembangan sistem mukosa, angiogenesis, dan sebagai pelindung terhadap penyakit melalui peningkatan sistem imunitasnya (Rawls *et al.*, 2006; Ringo *et al.*, 2007). Bakteri *Khurtia gibsonii* yang diisolasi dari usus ikan lele dumbo (*Clarias* sp.) menunjukkan kemampuan antibakterial terhadap bakteri *A. hydrophila* dan mampu meningkatkan sistem imunitas ikan tersebut ketika diuji tantang dengan bakteri tersebut. Bakteri *K. gibsonii* yang diberikan dalam pakan ikan lele dumbo juga mampu meningkatkan pertumbuhannya sebab memiliki kemampuan menghasilkan biotin (Agustina, 2007).

Beberapa bakteri dari usus ikan mampu menghasilkan senyawa antibakterial yang bisa menekan pertumbuhan bakteri patogen diantaranya bakteri *A. hydrophila* (Banerjee dan Ray, 2016). Penelitian yang dilakukan Bhatnagar dan Lamba (2015) menunjukkan bahwa bakteri yang diisolasi dari usus ikan mrigal, *Cirrhinus mrigala* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*, membantu aktivitas pencernaan dan meningkatkan pertumbuhan ikan tersebut. Pada usus ikan bandeng, *Channos chanos Forksal* ditemukan pula bakteri *Shewanella upenei* dan *S. algae* yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Vibrio fluvialis* dan *Photobacterium ganghwense* (Prayitno *et al.* 2015). Mourino *et al.* (2016) menemukan bakteri dari saluran pencernaan ikan lele hasil persilangan antara *Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans* yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro* dan mampu meningkatkan jumlah eritrosit saat ikan diberi perlakuan pakan dengan bakteri probiotik dan diuji tantang dengan bakteri tersebut. Pada usus ikan Kelabau ditemukan delapan isolat bakteri yang paling besar kemampuan daya hambatnya terhadap bakteri *A. hydrophila* AH-1 dan *Pseudomonas* sp. SP-1 secara *in vitro* (Agustina *et al.*, 2018).

Beberapa jenis bakteri autochthonous menunjukkan kemampuannya dalam menghambat bakteri patogen dengan jalan meningkatkan respon imunitas ikan tersebut (Nayak, 2010). Pada ikan nila (*O. niloticus*) berhasil diisolasi bakteri *B. pumillus* yang berpotensi sebagai probiotik dalam mengendalikan infeksi oleh bakteri *A. hydrophila* (Aly *et al.* 2008). Pada usus ikan Mas juga berhasil diisolasi beberapa jenis bakteri autochthonous yang mampu meningkatkan respon imunitas dan ketahanannya setelah diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* (Chi *et al.*, 2014). Bakteri autochthonous pada ikan grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) dari genus *Shewanella* dan *Aeromonas* mampu meningkatkan aktifitas fagositik, dan lisozim setelah diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila* (Wu *et al.*, 2015).

E. Probiotik

Probiotik merupakan salah satu alternatif yang dikembangkan dalam mengatasi permasalahan di akuakultur. Beberapa penerapan probiotik dalam akuakultur terbukti mampu meningkatkan resistensi organisme akuatik seperti larva ikan dan udang, ikan dan udang dewasa, bivalvia, crustacea, artemia dan rotifera serta hewan akuatik lain terhadap serangan infeksi (Gatesoupe 1999; Rengpipat et al. 2000; Verschuere et al. 2000). Istilah "probiotik" pertama kali diperkenalkan pada tahun 1965 oleh Lilley dan Stillwell. Berbeda dengan antibiotik, probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang dalam jumlah cukup memberikan manfaat positif bagi kesehatan inang (Reid 1999). Fuller (1989) mendefinisikan probiotik sebagai produk yang tersusun oleh biakan mikroba atau pakan alami dengan bentuk mikroskopik yang menguntungkan dan memberikan dampak bagi keseimbangan mikroba saluran usus hewan inang.

Verschuere *et al.* (2000) mendefinisikan bahwa probiotik sebagai penambahan mikroorganisme yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi inang melalui modifikasi bentuk asosiasi dengan inang atau komunitas mikroorganisme lingkungan hidupnya, mengoptimalkan penggunaan pakan atau meningkatkan nilai nutrisinya, berkompetisi dengan mikroorganisme yang patogen, memperbaiki kualitas air dan mampu berinteraksi dengan fitoplankton. Banyak kelompok Bakteri Asam Laktat (BAL) yang digunakan sebagai probiotik. Namun demikian tidak semua bakteri probiotik merupakan kelompok BAL. Genus bakteri yang sering digunakan sebagai probiotik adalah *Lactobacillus* (*Lactobacillus achidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*) (Gatesoupe 1994; Nikoskelainen *et al.* 2001), *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium adolescentis*, dan *Bifidobacterium longum*), *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*) (Rengpipat et al. 1998; Gullian *et al.* 2004; Ghosh *et al.* 2004), *Vibrio* (*Vibrio alginolyticus*) (Austin *et al.* 1995),

Micrococcus (Irianto & Austin 2002; Feliatra *et al.* 2004), *Leuconostoc* dan *Pseudomonas* (Gram *et al.* 1999; Feliatra *et al.* 2004).

Penggunaan probiotik di akuakultur telah banyak dilakukan dan dilaporkan lebih aman dibandingkan penggunaan antibiotik sintetik yang dapat menimbulkan resistensi bakteri terhadap antibiotik yang digunakan. Fuller (1992) menyatakan bahwa probiotik dianggap menguntungkan karena menghambat kolonisasi intestinum oleh mikroba yang bersifat merugikan baik melalui mekanisme kompetisi nutrisi maupun kompetisi ruang serta mampu memproduksi senyawa-senyawa yang bersifat antimikroba. Probiotik bersifat menguntungkan bagi inangnya karena mampu memperbaiki nutrisi dengan memproduksi vitamin-vitamin, detoksifikasi pangan maupun melalui aktivitas enzimatis. Probiotik dapat memproduksi bakteriosin yang bersifat selektif. Probiotik juga memproduksi senyawa penghambat seperti asam laktat, asam asetat, hidrogen peroksida, laktoperoksidase dan lipopolisakarida. Di dalam tubuh inang probiotik menghasilkan sejumlah nutrisi penting yang berfungsi dalam metabolisme inang seperti asam folat, kobalamin, biotin dan antioksidan (Balcazar *et al.* 2006).

F. Kriteria Bakteri Probiotik

Salminen *et al.* (2004) menyatakan bahwa terdapat beberapa kriteria yang harus dipenuhi oleh suatu probiotik, diantaranya adalah: (1) bersifat nonpatogenik dan mewakili mikrobiota normal pada usus inangnya, serta masih aktif pada kondisi asam lambung dan konsentrasi garam empedu yang tinggi dalam usus halus, (2) dapat tumbuh dan bermetabolisme dengan cepat serta terdapat dalam jumlah yang tinggi dalam usus halus, (3) mampu mengkolonisasi beberapa bagian dari saluran usus inangnya, (4) dapat memproduksi asam-asam organik secara efisien dan memiliki sifat antimikroba terhadap bakteri patogen, (5) mudah diproduksi, mampu tumbuh dalam sistem produksi skala besar, dan hidup selama kondisi penyimpanan. Kriteria lain yang harus dipenuhi untuk menjadikan mikroorganisme tertentu sebagai probiotik adalah mikroorganisme

tersebut tidak patogenik dan tidak menghasilkan senyawa yang bersifat toksik bagi hewan yang dipelihara (Fuller, 1998). Syarat probiotik adalah tidak patogen, toleran terhadap asam dan garam empedu, mempunyai kemampuan bertahan pada proses pengawetan dan dapat bertahan pada penyimpanannya serta memiliki kemampuan memberi efek kesehatan yang sudah terbukti (Shortt, 1999).

G. Mekanisme Kerja Bakteri Probiotik

Menurut Verschuere et al. (2000) beberapa kemungkinan model kerja probiotik yaitu: (1) produksi senyawa penghambat, (2) menghasilkan exogenous enzim, (3) kompetisi senyawa kimia atau ketersediaan energi, (4) kompetisi tempat penempelan, (5) peningkatan respons imun. Pada dasarnya ada 3 model kerja probiotik menurut Irianto (2003) yaitu (1) menekan populasi mikrobamelalui kompetisi dengan memproduksi senyawa-senyawa antimikroba atau melalui kompetisi nutrisi dan tempat pelekatan di dinding intestinum, (2) merubah metabolisme mikrobial dengan meningkatkan atau menurunkan aktivitas enzim, (3) menstimulasi imunitas melalui peningkatan kadar antibodi atau aktivitas makrofag.

Menurut Gomez-Gill *et al.* (2000), seleksi bakteri probiotik biasanya merupakan proses empiris didasarkan pada sedikit bukti ilmiah. Banyak kegagalan dalam G.penelitian bakeri probiotik yang terjadi karena salah memilih organisme. Tahapan seleksi memang sudah ditentukan, akan tetapi tahapan ini masih perlu disesuaikan berdasarkan spesies inang dan lingkungan, sehingga perlu pemahaman mekanisme kerja probiotik dalam menentukan kriteria seleksi bakteri probiotik potensial. Probiotik yang bekerja dalam tubuh inang harus mampu bertahan hidup dalam mukosa usus inang dan berkembang biak dengan cepat agar tidak terbawa keluar bersama sisa metabolisme inang (Vine *et al.*, 2004). Meskipun secara *in vitro* terbukti mampu menekan atau menghambat pertumbuhan bakteri patogen, namun apabila probiotik tersebut tidak dapat bertahan hidup dalam mukosa usus kemungkinan besar probiotik yang

menghambat pertumbuhan bakteri patogen tidak ditemukan pada uji in vivo (Ilmiah, 2012).

Mekanisme probiotik melindungi atau memperbaiki kondisi inangnya antara lain dengan menghambat pertumbuhan bakteri patogen melalui beberapa cara antara lain dengan (Simadibrata, 2010): 1. Memproduksi substansi-substansi penghambat. Probiotik mampu memproduksi zat-zat penghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun negatif. Zat-zat ini termasuk asam organik, hidrogen peroksida (H_2O_2), bakteriosin, reuterin yang mampu menghambat tidak hanya bakteri hidup namun juga produksi toksin. 2. Menghambat perlekatan bakteri patogen dengan berkompetisi di tempat perlekatan permukaan mukosa saluran cerna diduga juga merupakan salah satu cara probiotik menghambat invasi dari bakteri patogen. 3. Kompetisi nutrisi. Bakteri-bakteri yang menguntungkan (probiotik) akan berkompetisi dengan bakteri patogen dalam hal memperebutkan nutrisi dalam saluran cerna.

Gatesoupe (1999) menjelaskan bahwa karena ikan bersifat poikilotermik, maka asosiasi dari mikrobiota dalam tubuh ikan tergantung pada perubahan suhu dan perubahan salinitas. Selain itu mikrobiota yang terdapat di usus hewan akuatik dapat berubah secara cepat dengan adanya intrusi mikroba yang datang dari air dan makanan. Hal ini bergantung pada spesies inang, umur dan spesies mikrobiota. Perbedaan tersebut diduga karena perbedaan struktur anatomi dan kondisi enzimatik saluran pencernaan setiap jenis dan umur ikan yang berbeda akan mempengaruhi kemampuan mikrobiota untuk melekat dan berkembang. Usus besar mengandung mikroorganisme, suatu komponen yang kompleks dan mempunyai kegiatan metabolisme yang bermacam-macam. Fungsi utamanya adalah menampung energi dari karbohidrat yang tidak tercerna di bagian usus, hal ini dapat dimungkinkan oleh karena kemampuan fermentasi dan absorpsi mikroorganisme terhadap karbohidrat yang tidak terserap oleh dinding usus, sehingga mikroorganisme berperan dalam fermentasi karbohidrat. Mikroorganisme juga mempunyai peranan dalam sintesis vitamin B dan vitamin

K, dan metabolisme asam-asam empedu, sterol dan xenobiotic. Mikroorganisme dalam usus sangat responsif terhadap diet karbohidrat yang dapat difermentasi, misalnya polisakarida nonstarch, resistant starch dan oligosakarida. Adanya bahan tersebut bakteri akan tumbuh subur dan dapat mensintesis 15 gram biomassa yang disekresikan lewat tinja yang mengandung 1 gram Nitrogen bakterial (Tensiska, 2008).

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan tempat

Penelitian 'Penapisan Bakteri Potensial Probiotik dari Usus Ikan Air Tawar' dilaksanakan pada bulan Mei sampai Juli 2020. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Mulawarman, Samarinda.

B. Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian 'Penapisan bakteri potensial probiotik dari usus ikan lele dan mas' ini adalah scalpel, gunting, pinset, penggaris, mortar porselen, pastel, erlenmeyer, pipet tetes, tabung reaksi, cawan petri, beaker glass, gelas ukur, jarum ose, object glass, cover glass, batang pengaduk, tabung reaksi, penjepit tabung, rak tabung reaksi, mikroskop, lemari pendingin, laminar air flow, inkubator, oven, neraca analitik, bunsen, autoklaf, spatula, jangka sorong, kamera digital dan alat tulis.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan lele dan mas, isolat bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*, medium selektif MRSA (Man Ragosa Sharpe Agar), medium TSA (Tryptone Soya Agar), medium SA (Starch Agar), medium SMA (Skim Milk Agar), medium MIO (Motility Indole Ornithin), medium TSIA (Triple Sugar Iron Agar), medium LIA (Lysine Iron Agar), medium SC (Simmon Citrat Agar), medium Gelatin, medium OF, medium MRVP (Methyl Red-Voges Proskauer), medium gula-gula (arabinosa, glukosa, galaktosa, laktosa, maltosa, sukrosa, fruktosa, rafinosa, mannitol dan sorbitol), reagen H₂O₂ 3%, KOH 3%, methyl-red, reagen kovacs, iodine 2%, pewarnaan gram (Kristal Violet, lugol, alkohol aseton dan safranin), NaCl fisiologis 0,85%, HCl 0,1 N, minyak emersi, alkohol 70%, akuades, oxidase strips, paper disk, kapas, tissue gulung, plastik 10 kg, kertas label dan aluminium foil.

C. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Ikan yang dijadikan sampel adalah ikan lele dan mas. Ikan lele dan mas dibedah untuk diambil usus dan lambungnya, lalu dimasukkan ke dalam larutan fisiologis NaCl 0,85%. Usus ikan dihancurkan atau dihaluskan dengan menggunakan mortar porselen.

2. Isolasi Bakteri Probiotik

Usus ikan lele dan mas secara aseptis, bagian dalam (isi) usus ikan lele dan mas dikerok dengan menggunakan scalpel. Hasil kerokan tersebut kemudian dihaluskan dengan menggunakan mortar porselen dan pastel lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril dan diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis steril dengan pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} . Sebanyak 1 mL hasil pengenceran tadi kemudian diinokulasikan pada medium MRSA kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang menunjukkan zona bening disekitar koloni menunjukkan bahwa koloni tersebut adalah bakteri asam laktat.

3. Tahap Pemurnian Kultur Bakteri

Pemurnian dimulai dengan memilih koloni-koloni yang disekitarnya terdapat zona bening. Mensterilkan jarum ose, lalu disentuh pada permukaan koloni bakteri kemudian diinokulasikan pada permukaan medium MRSA dengan metode gores untuk mendapatkan koloni yang terpisah. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.

4. Pembuatan Stok Bakteri

Setiap koloni tunggal yang berbeda dan terbentuk setelah pemurnian kemudian masing-masing diinokulasikan pada medium TSA miring untuk persiapan pengujian selanjutnya.

5. Karakterisasi Bakteri Probiotik

Prosedur karakterisasi bakteri probiotik dilakukan secara mikroskopis seperti morfologi koloni meliputi: bentuk, elevasi, tepian warna dan ukuran

koloni, morfologi sel meliputi: bentuk sel dan warna sel. Selain itu dilakukan uji probiotik meliputi: uji ketahanan terhadap keasaman lambung (pH) dan uji hidrolisis pati dan uji hidrolisis kasein. Uji biokimia meliputi: uji gram, uji katalase, uji oksidase, uji motilitas, uji MIO, uji TSIA, uji LIA, uji MR-VP, uji Citrat, uji Gelatin, uji OF dan uji gula-gula. Serta dilakukan uji daya hambat patogen dengan menggunakan bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas sp.*

6. Uji daya hambat bakteri usus secara *in vitro* terhadap bakteri *A. hydrophila*

Untuk mengetahui bahwa isolat bakteri mempunyai potensi yang bagus sebagai bakteri probiotik maka perlu dilakukan uji daya hambat terhadap bakteri patogen. Bakteri patogen yang digunakan adalah *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas sp.* Metode yang digunakan adalah metode cawan sebar (spread plate). Bakteri patogen dan bakteri potensial probiotik disuspensikan hingga kekeruhannya sama dengan larutan suspensi Mc Farland yaitu 10⁸ CFU/ml. Bakteri patogen (*Aeromonas hydrophila*) diisolasi kedalam cawan petri yang berisi media TSA dengan teknik cawan sebar (spread plate), kemudian paper disk yang telah direndam ke dalam kultur cair isolat bakteri potensial probiotik ditanam dengan cara ditekan ke atas media TSA. Selanjutnya inkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam. Setelah inkubasi diamati adanya indikasi penghambatan dengan terbentuknya zona bening pada media yang berarti menunjukkan kemampuan menghambat bakteri uji patogen. Kemudian diameter zona bening yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong.

7. Uji Biokimiawi

a. Uji Gram

Pengamatan morfologi koloni dilakukan dengan teknik pewarnaan gram. Pertama-tama ulasan bakteri dibuat pada gelas objek dan dilakukan fiksasi. Sebanyak 2-3 tetes gram A (kristal violet) ditetaskan pada koloni bakteri, diamkan selama 60 detik. Kemudian preparat dicuci dengan menggunakan air mengalir lalu dikeringanginkan. Sebanyak 2-3 tetes gram B (larutan lugol) ditetaskan di atas preparat dan dibiarkan selama 60 detik. Preparat dicuci

dengan air mengalir lalu dikeringanginkan. Preparat kemudian ditetesi 2-3 tetes larutan alkohol-aseton dan dibiarkan selama 60 detik lalu dicuci kembali dan dikeringanginkan. Selanjutnya preparat ditetesi dengan larutan safranin sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 60 detik, lalu dicuci dan dikeringanginkan. Setelah itu diamati di bawah mikroskop.

b. Uji Katalase

Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose (ose bulat) dari masing-masing stok kultur kemudian dicelupkan ke dalam reagen H_2O_2 yang telah ditetaskan pada object glass. Hasil positif apabila terbentuk gelembung gas pada ose, dan hasil negatif apabila tidak terbentuk gelembung gas.

c. Uji Oksidase

Uji oksidase bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya enzim oksidase pada bakteri menggunakan Oxidase Test Strip. Uji oksidase dilakukan dengan mengoleskan koloni tunggal pada Oxidase Test Strip dengan menggunakan ose. Lalu dilihat perubahan yang terjadi. Apabila daerah tempat Oxidase Test Strip yang terkena bakteri berwarna biru tua keunguan maka oksidase positif, jika berwarna putih (tetap) maka bersifat negatif.

d. Uji Motilitas

Sebanyak 1 ose (ose lurus) isolat dari stok kultur lalu diinokulasikan dengan cara ditusuk pada medium MIO, lalu diinkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ selama 24 jam. Hasil positif (motil) apabila terdapat rambatan-rambatan di sekitar bekas tusukan jarum pada medium dan hasil negatif (non motil) bila tidak terdapat rambatan-rambatan disekitar bekas tusukan jarum ose pada medium.

e. Uji TSIA

Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasi ke dalam media TSIA dengan cara menusuk tegak lurus pada bagian butt (tusuk) dan cara zig zag pada bagian slant (miring) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu $29^{\circ}C$. Perubahan warna kemudian diamati, apabila bagian slant berwarna merah dan butt berwarna

kuning maka bakteri mampu memfermentasi glukosa, sedangkan apabila bagian slant dan butt keduanya berwarna kuning maka bakteri mampu memfermentasi sukrosa dan laktosa (Yusuf, 2009).

f. Uji Gelatin

Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasikan pada media cair Gelatin dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 29°C. Uji positif ditandai dengan media cair tetap mencair apabila telah diletakkan di dalam lemari es selama beberapa menit dan uji negatif ditandai dengan membekunya media gelatin jika diletakkan di dalam lemari es.

g. Uji Citrat

Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasi secara zig-zag pada permukaan agar miring media Simmons Citrate dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 29°C. Uji positif ditandai dengan berubahnya warna medium menjadi biru dan uji negatif ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna pada media (Sudarsono, 2008).

h. Uji MR (Methyl Red)

Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasi ke dalam media MR-VP dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 29°C. Setelah inkubasi selama 24 jam, media ditambahkan 3-4 tetes indikator Methyl Red. Uji positif ditandai dengan perubahan warna medium menjadi merah, artinya terbentuk asam dan uji negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada media (Hadioetomo, 1993).

i. Uji VP (Voges Proskauer)

Sebanyak 1 ose (ose bulat) isolat bakteri diambil dari stok kultur dan diinokulasikan pada medium MR-VP cair dalam tabung reaksi. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Medium kemudian ditambahkan 0,2 mL KOH 40% dan 0,6 mL alfa-naftol lalu dikocok selama 30 detik. Hasil positif jika medium berubah warna lembayung.

i. Uji LIA

Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasi secara tusuk lalu zig-zag pada permukaan agar miring media LIA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 29°C. Uji positif ditandai dengan berubahnya warna medium menjadi ungu dan uji negatif ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna pada media (Sudarsono, 2008).

k. Uji Gula-gula

Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam tabung-tabung reaksi yang berisi arabinosa, glukosa, galaktosa, laktosa, maltosa, sukrosa, fruktosa, rafinosa, mannitol dan sorbitol diinkubasi selama 24 jam pada suhu 29°C. Uji positif ditandai dengan berubahnya warna medium menjadi kuning dan apabila dalam tabung terdapat gelembung, berarti fermentasi tersebut menghasilkan gas (CO₂). Uji negatif ditandai dengan tidak berubahnya warna medium.

8. Uji Daya Patogenitas bakteri usus

Pada uji patogenitas, ikan lele dan mas disiapkan dalam unit yang berbeda dalam akuarium sebanyak 10 ekor per akuarium volume 30 liter. Ikan diadaptasikan sekitar tiga hari, setelah itu ikan diuji dengan cara menyuntikkan bakteri usus secara intramuscular dengan dosis 0,1 mL/ekor ikan dengan konsentrasi 10⁶ CFU/mL. Ikan dimasukkan kembali ke akuarium dan dihitung tingkat kelangsungan hidup selama tujuh hari.

9. Uji daya hambat secara *in vivo* dan pertumbuhan ikan

Ikan mas dan lele dipelihara dalam akuarium dengan volume 30 L, masing-masing 10 ekor ikan dan diadaptasikan sebelumnya. Ikan lalu diberi pakan dengan bakteri dengan dosis 0,1 mL/g pakan pada konsentrasi 10⁶ CFU/mL selama 13 hari. Pakan perlakuan diberikan sekali sehari pada pagi hari, sedangkan pada siang dan malam hari ikan diberi pakan tanpa bakteri usus. Ikan diuji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* pada hari ke-14 secara intramuscular

dengan dosis 0,1 mL/ekor ikan dengan konsentrasi 10^6 CFU/m. Jumlah ikan yang mati dihitung setelah ujiantang sampai hari terakhir penelitian yaitu hari ke-21, untuk mengetahui tingkat kelangsungan hidupnya. Jumlah bakteri *A. hydrophila* dalam darah dilakukan dengan mengambil dara pada pangkal ekor ikan dan dilakukan penghitungan total bakteri (TPC) dengan metode tuang dalam media GSP. Pertumbuhan ikan diukur dengan cara menimbang berat awal dan akhir ikan selama penelitian dengan pemberian bakteri usus.

D. Pengumpulan dan Analisis Data

Data yang dikumpulkan pada penelitian ini terdiri dari:

1. Karakteristik morfologi isolat bakteri dari usus ikan lele dan ikan mas.
2. Diameter zona hambat bakteri usus terhadap bakteri *A. hydrophila*.
3. Karakteristik biokimiawi lima isolat bakteri usus dengan diameter zona hambat terbesar.
4. Tingkat kelangsungan hidup ikan lele dan ikan mas pada uji patogenitas lima isolat bakteri usus.
5. Tingkat kelangsungan hidup ikan lele dan ikan mas pada uji daya hambat secara *in vivo*
6. Jumlah bakteri *A. hydrophila* dalam darah ikan lele dan ikan mas pada uji daya hambat secara *in vivo*.
7. Pertumbuhan ikan lele dan mas setelah diberi pakan dengan bakteri usus.

Data yang diperoleh selamam penelitian dianalisis dalam bentuk tabel dan gambar.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Isolasi dan Pemurnian Bakteri

Pada penelitian ini telah berhasil diisolasi bakteri dari usus ikan air tawar yaitu ikan lele dan mas masing-masing sebanyak 28 dan 11 isolat bakteri. Total 39 isolat bakteri yang selanjutnya diuji secara *in vitro* menunjukkan kemampuan yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *A. hydrophila*. Adapun karakter isolat bakteri tersebut ditunjukkan pada Tabel 4.1. dan 4.2

Tabel 4.1. Kode dan morfologi isolat bakteri yang berasal dari usus ikan lele

Kode isolate	Morfologi koloni		
	Warna	Bentuk	Tepian
A	PTr	MT	Karang
B	PK	MY	Halus
C	KK	MY	Halus
D	KN	MT	Karang
E	PTr	MT	Karang
F	PK	MT	Karang
AL	PK	MY	Halus
AL1	PH	MB	Karang
AL2	KN	MB	Karang
AL3	KN	MB	Halus
AL5	PTr	MT	Karang
AL7	PK	MY	Halus
AL8	PH	MB	Halus
BB1	PK	MB	Halus
BB2	KK	MT	Halus
BK	PTr	MY	Halus
BK1	KK	MB	Karang
BK2	PK	MB	Halus
TA	PH	MY	Karang
TM1	PK	MY	Karang
TM2	KK	MB	Karang
TM3	KN	MB	Karang
TB1	PH	MB	Karang
TB2	KK	MT	Halus
TB3	PK	MB	Halus
R1	PK	MT	Karang
R2	PH	MB	Karang
R3	PH	MT	Karang

Keterangan : PK = Putih Krem PH = Putih PTr = Putih Transparan KN = Kuning
 KK = Kuning Krem MR = Merah MB = Membulat MY = Menyebar
 MT = Menyebar Tidak rata

Tabel 4.2. Kode dan morfologi isolat bakteri yang berasal dari usus ikan mas

Kode isolat	Morfologi koloni		
	Warna	Bentuk	Tepian
P1	PK	MT	Karang
P2	KN	MT	Karang
P3	Ptr	MB	Halus
P4	KK	MT	Halus
P5	KN	MT	Karang
P6	Ptr	MT	Halus
P7	KN	MB	Halus
P8	PH	MB	Halus
P9	PK	MB	Halus
P10	Ptr	MB	Halus
P11	KN	MB	Halus

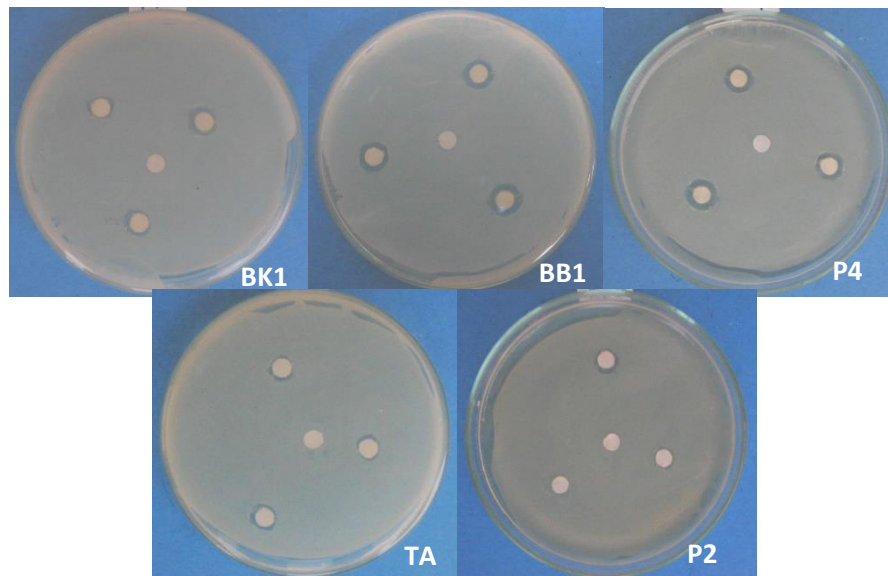
Keterangan : PK = Putih Krem PH = Putih Ptr = Putih Transparan KN = Kuning
 KK = Kuning Krem MR = Merah MB = Membulat MY = Menyebar
 MT = Menyebar Tidak rata

Berdasarkan ciri-ciri morfologi diperoleh adanya kesamaan antara beberapa isolat yang berasal dari usus ikan lele dan ikan mas. Identifikasi bakteri hanya dilakukan pada lima isolat yang digunakan pada pengujian selanjutnya setelah melalui beberapa tahap seleksi yaitu isolat P4, BB1, P2, TA dan BK1, sehingga tidak diketahui distribusi jenis bakteri yang ada di usus ikan lele dan mas.

2. Uji Penghambatan Bakteri terhadap *A. hydrophila* secara *In Vitro*

Bakteri hasil isolasi berjumlah 39 isolat, yang berasal dari usus dan air kolam pemeliharaan ikan lele dumbo diuji secara *in vitro* dengan *A. hydrophila* menggunakan metode Kirby-Bauer (Lay, 1994). Hasil seleksi ini diperoleh lima isolat bakteri yang mampu menghasilkan zona hambat terbesar terhadap pertumbuhan *A. hydrophila* (Gambar 4.1).

Wilayah jernih sekitar koloni atau pertumbuhan *A. hydrophila* menunjukkan bahwa bahan antimikrobal yang dihasilkan oleh mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Kepekaan *A. hydrophila* terhadap bahan antimikrobal ditunjukkan oleh luasnya wilayah jernih sekitar pertumbuhan *A. hydrophila*. Luasnya zona hambat yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 4.3.



Gambar 4.1. Zona hambat yang dihasilkan pada uji *in vitro*

Tabel 4.3. Isolat bakteri hasil isolasi dan luas zona hambat (mm)

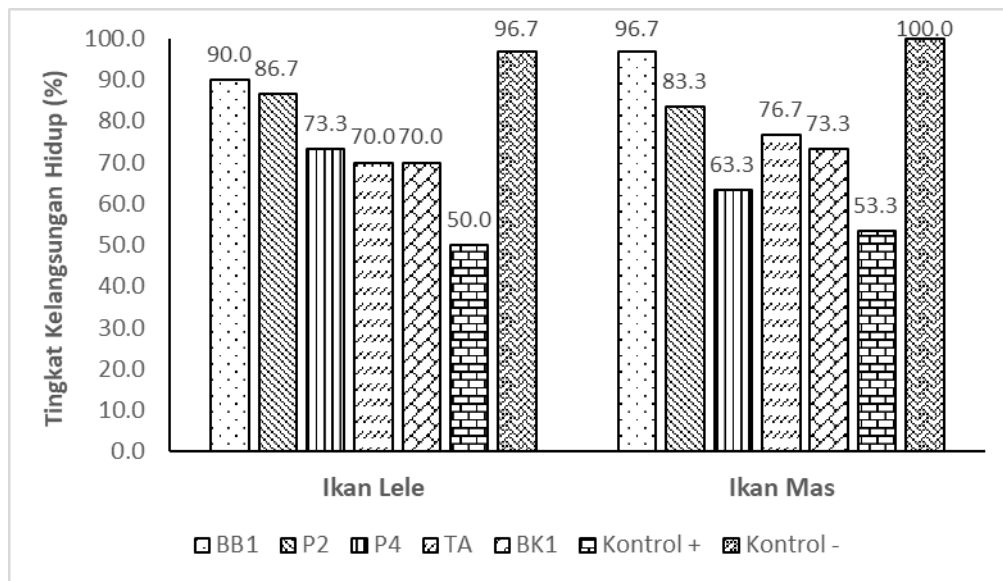
Kode Isolat	Asal Isolat	Zona hambat (mm)	Kode Isolat	Asal Isolat	Zona hambat (mm)
A	Usus ikan lele	6.0	TM2	Usus ikan lele	8.3
B	Usus ikan lele	6.0	TM3	Usus ikan lele	6.9
C	Usus ikan lele	6.5	TB1	Usus ikan lele	6.0
D	Usus ikan lele	7.0	TB2	Usus ikan lele	6.5
E	Usus ikan lele	6.0	TB3	Usus ikan lele	6.0
F	Usus ikan lele	6.0	R1	Usus ikan lele	6.0
AL	Usus ikan lele	7.0	R2	Usus ikan lele	6.0
AL1	Usus ikan lele	7.2	R3	Usus ikan lele	6.9
AL2	Usus ikan lele	7.1	P1	Usus ikan mas	7.8
AL3	Usus ikan lele	6.0	P2	Usus ikan mas	9.3
AL5	Usus ikan lele	6.0	P3	Usus ikan mas	8.9
AL7	Usus ikan lele	8.0	P4	Usus ikan mas	14.0
AL8	Usus ikan lele	8.1	P5	Usus ikan mas	6.8
BB1	Usus ikan lele	11.7	P6	Usus ikan mas	7.0
BB2	Usus ikan lele	7.0	P7	Usus ikan mas	6.0
BK	Usus ikan lele	8.0	P8	Usus ikan mas	6.0
BK1	Usus ikan lele	11.3	P9	Usus ikan mas	8.0
BK2	Usus ikan lele	7.0	P10	Usus ikan mas	7.8
TA	Usus ikan lele	10.3	P11	Usus ikan mas	7.0
TM1	Usus ikan lele	8.1			

3. Uji Patogenitas Bakteri Usus

Patogenitas bakteri hasil seleksi daya hambat secara *in vitro* yaitu P4, BB1, BK1, TA dan P2 terhadap ikan lele dan ikan mas perlu diketahui sebelum ikan diuji tantang dengan bakteri *A. hydrophila*. Patogenitasnya diketahui dari tingkat kelangsungan hidup ikan lele dumbo yang diinfeksi dengan kedua bakteri tersebut (Gambar 4.2).

Hasil pengujian patogenitas kelima bakteri tersebut pada ikan lele dengan injeksi pada konsentrasi 10^6 CFU/ekor isolat bakteri BB1 memberikan peluang hidup yang paling besar diikuti oleh isolat P4, masing-masing sebesar 90,0% dan 86,7%, selanjutnya isolat P2, BK1 dan TA masing-masing sebesar 73,3%, 70,0% dan 70,0%. Jika dibandingkan dengan tingkat kelangsungan hidup ikan lele dumbo yang diinjeksi *A. hydrophila* dengan konsentrasi yang sama dan telah diketahui patogen, yaitu sebesar 50,0% maka kedua isolat bakteri tersebut masih bisa digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Hasil pengujian patogenitas kelima bakteri tersebut pada ikan mas dengan injeksi pada konsentrasi 10^6 CFU/ekor isolat bakteri BB1 memberikan peluang hidup yang paling besar diikuti oleh isolat P4, masing-masing sebesar 96,7% dan 83,3%, selanjutnya isolat TA, BK1 dan P2 masing-masing sebesar 76,7%, 73,3% dan 63,3%. Jika dibandingkan dengan tingkat kelangsungan hidup ikan lele dumbo yang diinjeksi *A. hydrophila* dengan konsentrasi yang sama dan telah diketahui patogen, yaitu sebesar 53,3% maka kedua isolat bakteri tersebut masih bisa digunakan untuk pengujian selanjutnya.



Gambar 4.2. Tingkat kelangsungan hidup ikan lele dan ikan mas pada uji patogenitas bakteri usus. Kontrol + : *A. hydrophila*, Kontrol - : PBS

4. Identifikasi Lima Isolat dari Usus Ikan Lele dan Mas secara Biokimiawi

Lima isolat bakteri masing-masing tiga isolat yang berasal dari ikan lele yaitu BB1, TA dan BK1 serta dua isolat yang berasal dari usus ikan mas yaitu P2 dan P4 selanjutnya diidentifikasi secara biokimiawi (Holt *et al.*, 1994). Karakteristik kelima isolat tersebut dicantumkan pada Tabel 4.4. Berdasarkan karakteristik biokimiawi maka kelima isolat tersebut diidentifikasi sebagai *Kurthia* sp. (BB1), *Pseudomonas* sp. (TA, BK1, P4) dan *Bacillus* sp.(P2).

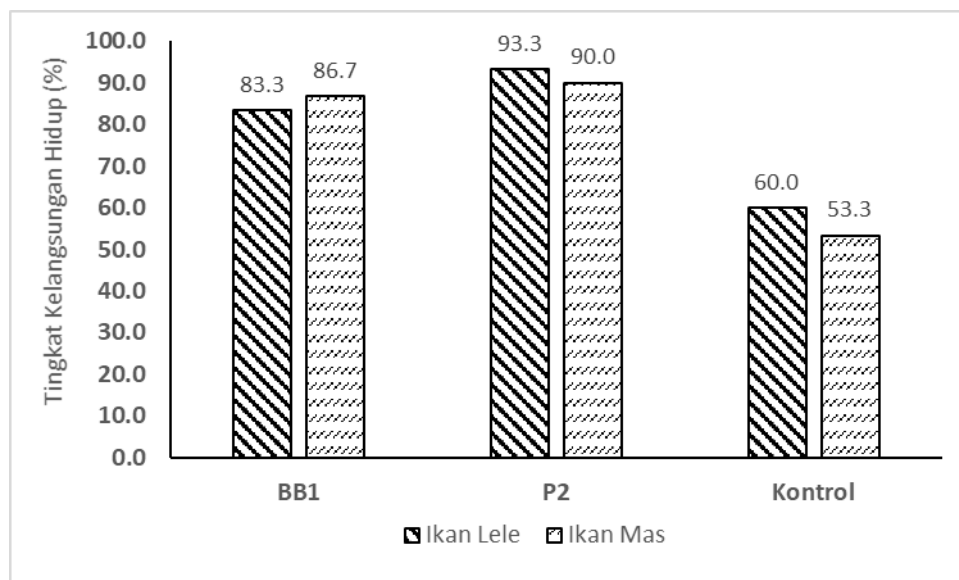
Tabel 4.4. Karakteristik Biokimiawi Lima Isolat dari Usus Ikan Lele dan Ikan Mas

Karakteristik	Isolat				
	BB1	TA	BK1	P4	P2
Pewarnaan gram	+	-	-	-	+
Motilitas	+	+	+	+	+/-
Katalase	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-
Sitrat	+	-	-	-	-
Oksidase	-	-	-	-	+/-
Hidrolisis Gelatin	-	D	D	D	+
Hidrolisis Casein	-	-	-	-	D
Glukosa	-	+	+	+	+
Fruktosa	+	-	-	-	+
Maltosa	-	D	D	D	+
Manitol	-	-	-	-	-

Keterangan : D = Dubius (meragukan)

5. Uji Penghambatan Bakteri Usus terhadap *A. hydrophila* secara *In Vivo*

Pada uji ini dua isolat bakteri usus ikan yang berasal dari ikan lele dan mas yaitu masing-masing isolat BB1 dan P2 diuji kemampuannya dalam menghambat perkembangan bakteri *A. hydrophila* secara *in vivo*. Kemampuan tersebut diamati dari tingkat kelangsungan hidup ikan lele dan ikan mas yang diberi pakan kedua isolat bakteri usus tersebut lalu diuji tantang dengan bakteri *A. hydrophila* sampai hari ke-21 (Gambar 4.3). Parameter uji yang lain adalah jumlah bakteri *A. hydrophila* dalam darah ikan lele dan mas setelah diuji tantang dengan patogen tersebut (Tabel 4.4).



Gambar 4.3. Tingkat kelangsungan hidup ikan lele dan ikan mas pada uji daya hambat bakteri usus secara *in vivo*

Tingkat kelangsungan hidup ikan setelah diuji tantang dengan bakteri patogen *A. hydrophila* menunjukkan hasil yang berbeda pada perlakuan yang diberi bakteri usus ikan lele dan ikan mas. Tingkat kelangsungan hidup ikan pada akhir pemeliharaan atau hari ke-21 tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan isolat P2 sebesar 93,3% diikuti oleh perlakuan isolat BB1 dan kontrol masing-masing 86,7% dan 60%. Hal yang sama ditunjukkan oleh ikan mas dengan perlakuan isolat P4 tertinggi tingkat kelangsungan hidupnya diikuti oleh isolat BB1 dan yang paling rendah pada perlakuan kontrol. Pada perlakuan isolat P2 tingkat

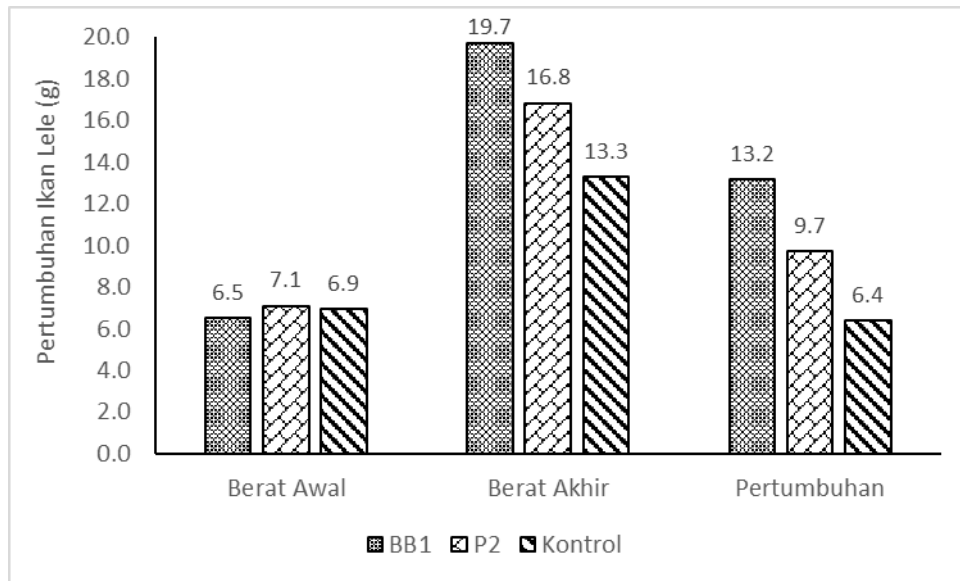
kelangsungan hidup ikan mas sebesar 90,0%, isolat BB1 sebesar 83,3% dan kontrol sebesar 53,3%.

Tabel 4.5. Jumlah Bakteri *A. hydrophila* dalam Darah Ikan Lele dan Ikan Mas

Perlakuan	Jumlah Bakteri <i>A. hydrophila</i> dalam Darah Ikan ($\times 10^4$ CFU/mL)				
	Hari ke-15	Hari ke-16	Hari ke-17	Hari ke-19	Hari ke-21
Ikan lele:					
BB1	6,1	4,2	3,5	2,9	1,6
P2	5,7	3,2	2,5	2,0	1,5
Kontrol	8,9	8,5	7,8	6,1	5,0
Ikan mas:					
BB1	6,7	4,7	4,3	3,5	2,6
P2	6,2	4,2	4,2	3,1	2,2
Kontrol	7,8	6,9	6,3	5,8	5,3

Jumlah bakteri *A. hydrophila* dalam darah ikan lele dan ikan mas menunjukkan perbedaan antar perlakuan dan mengalami penurunan selama pengamatan (Tabel 4.5). Secara umum kisaran bakteri dalam darah ikan lele $1,5-8,9 \times 10^4$ CFU/mL. Jumlah bakteri *A. hydrophila* tertinggi pada hari ke-15 atau sehari setelah diuji tantang ditunjukkan pada perlakuan kontrol sebesar $8,9 \times 10^4$ CFU/mL dan mengalami penurunan sampai akhir penelitian. Perlakuan pemberian isolat bakteri BB1 dan P2 menunjukkan jumlah bakteri *A. hydrophila* lebih rendah dibanding kontrol mulai hari ke-15 sampai hari ke-21, masing-masing $1,6-6,1 \times 10^4$ CFU/mL dan $1,5-5,79 \times 10^4$ CFU/mL.

Jumlah bakteri *A. hydrophila* dalam darah ikan mas setelah diuji tantang dengan menunjukkan perbedaan antara perlakuan kontrol dengan pemberian isolat bakteri usus dan mengalami penurunan sampai akhir penelitian. Perlakuan pemberian isolat bakteri usus pada ikan mas menunjukkan jumlah bakteri *A. hydrophila* lebih rendah dibanding perlakuan kontrol. Pada perlakuan BB1 dan P2 jumlah bakteri *A. hydrophila* dalam darah berkisar antara $2,6-6,7 \times 10^4$ CFU/mL dan $2,2-6,2 \times 10^4$ CFU/mL, sedangkan pada kontrol sebesar $5,3-7,8 \times 10^4$ CFU/mL.



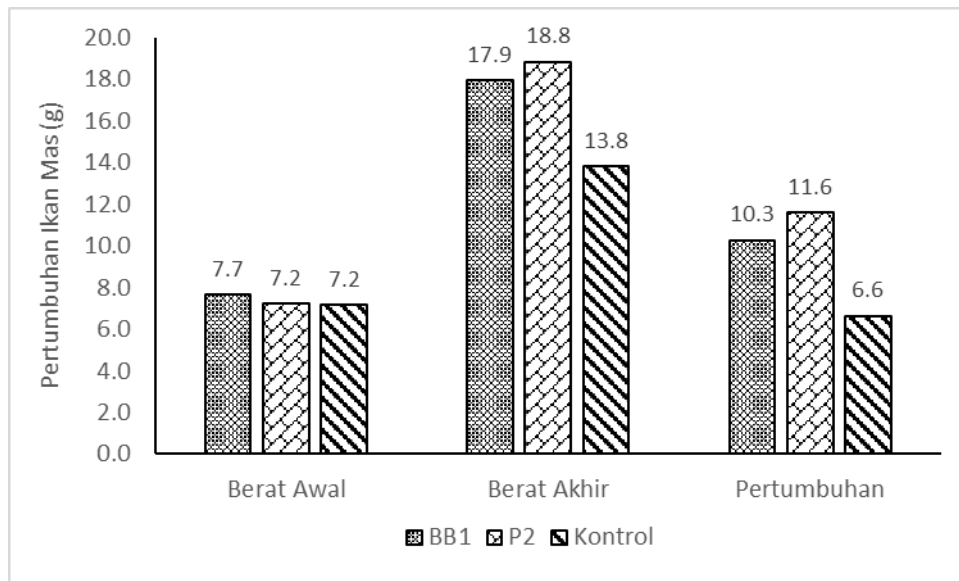
Gambar 4.4. Pertumbuhan Ikan lele dengan pemberian bakteri usus

6. Pertumbuhan Ikan Lele dan Mas dengan Pemberian Isolat Bakteri Usus

Pertumbuhan ikan lele dan ikan mas selama 21 hari perlakuan pemberian bakteri dari usus ikan tersebut menunjukkan perbedaan dibanding perlakuan kontrol, hal ini ditunjukkan pada Gambar 4.4 dan 4.5. Pertumbuhan ikan lele tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan BB1 sebesar 13,2 g diikuti oleh P4 sebesar 9,7 g dan kontrol sebesar 6,4 g. hal yang berbeda ditunjukkan oleh ikan mas. Pertumbuhan tertinggi pada perlakuan P4 sebesar 11,6 g diikuti perlakuan BB1 sebesar 10,3 g dan kontrol sebesar 6,6 g.

B. Pembahasan

Ikan lele dan mas yang merupakan sampel pada penelitian ini merupakan ikan cukup banyak dibudidayakan di daerah ini. Penyakit infeksius dari golongan bakteri yang umum menyerang ikan lele diantaranya adalah bakteri *A. hydrophila* (Tucker *et al.*, 2019). Penurunan kualitas air budidaya sebagai akibat dari sistem budidaya semi intensif dengan padat tebar yang tinggi dan pakan dalam jumlah besar rentang menyebabkan terjadinya infeksi oleh bakteri fakultatif pada ikan carp (Sunitha dan Krishna, 2016; Silva dan Wong, 2019).



Gambar 4.5. Pertumbuhan ikan mas dengan pemberian bakteri usus

Bakteri yang berasal dari usus ikan memiliki peran dalam melindungi ikan tersebut dari infeksi bakteri patogen. Mekanisme yang melibatkan microflora, terutama bakteri di usus ikan terkait dengan kemampuan menghasilkan senyawa antimikroba (produk seluler), meningkatkan respon imunitas serta membantu memperbaiki pemanfaatan nutrisi dalam saluran pencernaan. Mikroba yang berperan menguntungkan tersebut dikenal sebagai probiotik. Penelitian mengenai potensi microflora yang berperan sebagai probiotik pada budidaya ikan maupun biota akuatik lainnya sudah banyak dilakukan dan menunjukkan hasil yang positif (Agustina *et al.*, 2018; Hasan dan Banerjee 2020, Caipang *et al.*, 2020)

Upaya untuk mendapatkan kandidat bakteri probiotik telah dilakukan dalam rangka meningkatkan produksi ikan budidaya. Metode yang paling umum untuk mendapatkan bakteri berpotensi menghambat bakteri patogen secara *in vitro* dengan metode Kirby-Bauer, yaitu melihat zona bening yang dihasilkan oleh bakteri usus yang ditumbuhkan pada kertas cakram (berdiameter 6,0 mm) pada media agar yang sebelumnya ditumbuhkan bakteri patogen. Penelitian ini merujuk pada metode tersebut dengan kisaran zona bening antara 6,0-14,0 mm. Kisaran nilai zona bening ini menunjukkan bahwa isolat bakteri dari usus ikan lele dan mas memiliki kemampuan yang bervariasi dalam menghasilkan senyawa

yang bersifat antimikroba terhadap bakteri patogen *A. hydrophila*. Menurut Davis dan Stout (1971) aktivitas antibakteri seperti ini termasuk kisaran sedang sampai kuat. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Agustina *et al.* (2018) pada ikan kelabau (*Osteochilus melanopleurus*), juga penelitian pada ikan yang lain (Prayitno *et al.*, 2015; Ramesh *et al.*, 2015; Mourino *et al.*, 2016).

Isolat bakteri tertentu yang menunjukkan kemampuan menghambat bakteri patogen secara *in vitro* tidak semuanya bersifat aman bagi ikan, sehingga untuk mendapatkan bakteri yang aman bagi ikan budidaya perlu dilakukan uji patogenitas dari isolat bakteri tersebut pada ikan (Giri *et al.*, 2012). Uji patogenitas yang dilakukan pada ikan lele dan ikan mas menunjukkan hasil yang berbeda. Tingkat kelangsungan hidup ikan lele berkisar antara 70,0-90,0% sedangkan pada ikan mas sebesar 63,3-96,7%. Lima isolat bakteri pada uji *in vitro* menunjukkan kemampuan antibakteri yang kuat terhadap *A. hydrophila* ternyata tidak semuanya aman bagi ikan lele dan ikan mas, hal ini terlihat dari tingkat kelangsungan hidup kedua ikan tersebut setelah diinjeksi dengan isolat bakteri pada konsentrasi 10^6 CFU/mL dengan dosis 0,1 mL/ekor. Dua isolat bakteri usus yang menghasilkan tingkat kelangsungan hidup yang tertinggi yaitu isolat P2 dan BB1 selanjutnya digunakan pada uji secara *in vivo*.

Lima bakteri dengan daya hambat terbesar terhadap bakteri *A. hydrophila* pada uji *in vitro* yaitu P2, TA, BK1, P2 dan BB1 diidentifikasi secara biokimiawi dan hasil identifikasi menunjukkan tiga isolat bakteri usus adalah bakteri *Pseudomonas* sp. (TA, BK1 dan P4), isolat BBi sebagai *Kurthia* sp. dan P2 sebagai *Bacillus* sp. Ketiga jenis bakteri ini memang biasa ditemukan di perairan tawar (Holt *et al.*, 1994) maupun dalam saluran pencernaan ikan (Agustina *dkk.*, 2014; Wulandari *et al.*, 2015)

Penelitian oleh Fernandez *et al.* (1996) terhadap telur ikan bandeng menunjukkan bahwa *Pseudomonas* sp. merupakan spesies yang dominan diikuti dengan *Vibrio* spp., *Plesiomonas* dan Enterobacteriaceae. Menurutny *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Plesiomonas* merupakan spesies-spesies flora normal

mikroba perairan. Irianto (2003) menambahkan bahwa kemungkinan penggunaan isolat-isolat *Vibrio*, *Pseudomonas* dan *Plesiomonas* yang non-opportunistik dan non-patogenik mungkin akan memberi hasil positif terhadap pengendalian mikroba pada telur serta meningkatkan sintasan larva.

Aktivitas antagonistik dari beberapa spesies *Pseudomonas* terhadap beberapa isolat *A. hydrophila* telah diteliti oleh Das *et al.* (2006). Hasilnya menunjukkan bahwa 4 fraksi berbeda komponen seluler, yaitu produk seluruh sel, produk seluruh sel yang dibunuh dengan panas, produk intraseluler, produk ekstraseluler dari seluruh spesies *Pseudomonas* sama efektifnya menekan pertumbuhan isolat-isolat *A. hydrophila*, sebagaimana diukur dengan zona hambat dalam tes sensitivitas secara *in vitro*. Selanjutnya berdasarkan hasil ini dinyatakan bahwa *Pseudomonas* mempunyai potensi menekan perkembangan *A. hydrophila* yang menginfeksi ikan. Hal ini mendukung penelitian yang telah dilakukan secara *in vitro*, bahwa ternyata bakteri *Pseudomonas sp.* mampu menghambat *A. hydrophila* dengan adanya wilayah jernih atau zona hambat di sekitar pertumbuhan *A. hydrophila*. Wulandari *et al.* (2015) menemukan beberapa jenis bakteri penghasil asam laktat seperti *Bacillus*, *Lactobacillus* dan *Eubacterium*, di saluran pencernaan ikan lele.

Tingkat kelangsungan hidup ikan lele dan mas pada uji daya hambat secara *in vivo* menunjukkan bahwa pemberian dua isolat bakteri masing-masing *Bacillus sp.* (P2) dan *Kurthia sp.* (BB1) dalam pakan ikan mampu menekan infeksi dari bakteri *A. hydrophila*. Jika dibanding kontrol (pemberian larutan PBS), tingkat kelangsungan hidup ikan lele dan mas pada uji *in vivo* jauh lebih tinggi. Hal ini menjadi indikasi bahwa di dalam tubuh ikan lele dan mas bakteri tersebut mampu menekan perkembangan bakteri *A. hydrophila* sehingga tingkat kelangsungan hidupnya lebih tinggi dibanding dengan kontrol, yaitu 83,3 dan 86,7 (*Kurthia sp.*) dan 90,0 dan 93,3 (*Bacillus sp.*) . Tingkat kelangsungan hidup ikan lele dan mas yang lebih tinggi dibanding kontrol pada penelitian ini terbukti dengan adanya parameter jumlah bakteri *A. hydrophila* dalam darah selama

pengamatan setelah ujiantang sampai hari ke-21 atau terakhir penelitian. Jumlah bakteri *A. hydrophila* pada perlakuan pemberian bakteri *Kurthia* sp. dan *Bacillus* sp. lebih rendah dibanding pada perlakuan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa kedua isolat bakteri tersebut mampu menekan pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dalam tubuh ikan sehingga infeksi yang terjadi tidak mengakibatkan kematian yang signifikan pada ikan uji.

Pertumbuhan ikan lele dan mas dengan pemberian kedua jenis bakteri tersebut lebih tinggi dibanding kontrol menunjukkan bahwa keduanya mampu membantu proses pencernaan dan metabolisme nutrisi yang diberikan lewat pakan. Probiotik dianggap menguntungkan inang antara lain karena memperbaiki nutrisi, antara lain adanya beragam mikroba yang menguntungkan memiliki kemampuan mensintesa biotin (Sugita *et al.* 1992). Hal ini sesuai dengan salah satu sifat dari *Kurthia* sp., yang memiliki gen-gen yang mampu mensintesis biotin. Gen-gen biosintesis biotin dari *Kurthia* sp. diklon dari *Kurthia* sp. 538-KA26 dan berhasil di temukan 11 gen biosintesis biotin (Gene 2001). Menurut Mason (2001), biotin merupakan vitamin yang larut dalam air dan termasuk salah satu vitamin B kompleks, berfungsi dalam metabolisme metabolisme karbohidrat dan lemak, sintesa asam lemak dan katabolisme asam amino dan defisiensi biotin akan menyebabkan menurunnya pertumbuhan dan kerusakan dermatologis. Biotin membantu memacu pertumbuhan dan persembuhan luka pada kulit. Biotin dapat disintesa oleh mikroba usus dan diduga peranan tersebut berkontribusi nyata pada hewan non-ruminan.

Kemampuan biosintesa biotin diduga menyebabkan pertumbuhan yang cukup tinggi pada perlakuan pemberian isolat bakteri *Kurthia* sp. dalam pakan ikan lele dan mas. Metabolisme yang lebih efektif dapat memacu pertumbuhan ikan tersebut lebih baik pada perlakuan tersebut dibanding pada kontrol. Berdasarkan pendapat di atas, maka selain mampu mendukung pertumbuhan ikan uji, biotin juga mampu membantu persembuhan luka pada kulit. Hal ini

penting dalam mempercepat pulihnya ikan setelah infeksi *A. hydrophila* yang menyebabkan kerusakan pada kulit ikan lele dumbo.

Bakteri *Bacillus* sp. merupakan kelompok bakteri asam laktat yang diketahui memiliki peran sebagai probiotik pada biota akuatik. Bakteri asam laktat mampu memfermentasi karbohidrat sehingga membantu proses pencernaan pakan ikan dan menghasilkan pertumbuhan yang lebih baik pada ikan lele dan mas. Nandi *et al.* (2017) menemukan bahwa strain bakteri *Bacillus* sp. MVF1 mampu menekan infeksi bakteri *A. hydrophila* dan berpotensi sebagai probiotik pada ikan *Labeo rohita*. Bakteri *Bacillus* sp. QSI-1 memiliki kemampuan yang baik dalam menekan pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dalam usus ikan dan berpotensi dalam menekan penyebaran penyakit infeksius terutama yang disebabkan oleh bakteri pada ikan (Zhou *et al.*, 2016). Parthasarathy dan Ravi (2011) menemukan bahwa satu spesies dari *Bacillus* mampu menekan infeksi bakteri *A. hydrophila* dan meningkatkan pertumbuhan ikan *Catla catla*.

BAB IV

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari penelitian ini dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Isolat bakteri yang diisolasi dari usus ikan lele dan mas menunjukkan kemampuan antibakterial terhadap bakteri *A. hydrophila*, dengan kriteria berkisar antara sedang-kuat.
2. Lima isolat yang menunjukkan kemampuan daya hambat terbaik secara *in vitro* diidentifikasi secara biokimiawi sebagai bakteri *Pseudomonas* sp. (isolat TA, BK1 dan P4), isolat BB1 sebagai *Kurthia* sp. dan P2 sebagai *Bacillus* sp.
3. Isolat bakteri *Kurthia* sp. dan *Bacillus* sp. mampu menekan infeksi bakteri *A. hydrophila* secara *in vivo* dengan meningkatnya kelangsungan hidup ikan lele dan mas serta menekan jumlah bakteri *A. hydrophila* dalam darah ikan tersebut.
4. Isolat bakteri *Kurthia* sp. dan *Bacillus* sp. mampu berperan meningkatkan pertumbuhan ikan lele dan mas sehingga berpotensi sebagai bakteri probiotik pada ikan air tawar

B. Saran

Beberapa hal yang bisa disarankan adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian kemampuan isolat bakteri *Kurthia* sp. dan *Bacillus* sp. yang berasal dari usus ikan lele dan mas dalam meningkatkan respon imunitasnya
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang penapisan bakteri potensial probiotik pada ikan-ikan air tawar lain terutama jenis ikan lokal, agar produk probiotik nantinya bisa dimanfaatkan pada budidaya ikan air tawar di daerah ini.

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.
- Agustina, S.B. Prayitno, A. Sabdono and G. Saptiani. 2018. Antagonistic Activity of Kelabau Fish (*Osteochilus melanopleurus*) Gut Bacteria against *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas* sp. *AAFL Bioflux* 11 (6): 1859-1868.
- Akter, N., Parvez .I. & Patwari. ZW., 2016. Beneficial Effects of Probiotics in Aquaculture. *International Journal Fisheries and Aquatic Studies* 2016. 4(5): 494- 499.
- Angka, S.L. 2005. Kajian Penyakit Motile Aeromonas Septicemia (MAS) pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp.): Patologi, Pencegahan dan Pengobatannya dengan Fitofarmaka. (Disertasi). Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Bachtiar, Y. 2002. *Pembesaran Ikan Mas Dikolam Pekarangan Agromedia* Pustaka, Jakarta.
- Cappucino, J. G. 1983. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Addison Wesley Publishing Company.
- Cruz, P.M., Ibanez, A.L., Hermosillo, O.A.M. & Saad, H.C.R., 2012. Use Of Probiotics in Aquaculture. Review Article. *International Scholarly Research Network. ISRN Microbiology*. Vol.12. pp 13.

- 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.
- Fardiaz, D. 1992. Mikrobiologi Pangan I. Gramedia. Jakarta.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in Man and Animal. J Appl Bacteriol. 66: 365-378.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The Use of Probiotics in Aquaculture. Aquaculture. 180:147-165.
- Gomez-Gill, B., A. Roque., J. F. Turnbull. 2000. The Use and Selection of Probiotic Bacteria Are Use in The Culture of Larval Aquatic Organism. Aquaculture. 191:259-270.
- Hadioetomo, R. S. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. Penerbit Gramedia. Jakarta.
- Hagi,T and Hasino T., 2009. Screening and Characterization of Potencial Probiotics Lactic Acid Bacteria From Cultured Common Carp Intestine. Biosci.Biotechnol.Biochem. 73(7) : 1479-1483.
- Hardi, E. H. dan C. A. Pebrianto. 2012. Isolasi dan Uji Postulat Koch *Aeromonas* sp. dan *Pseudomonas* sp. pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Sentra Budidaya Loa Kulu Kabupaten Kutai Kartanegara. Jurnal Ilmu Perikanan 16 (2):35-39.
- 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.
- 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.
- Ilmiah. 2012. Seleksi Bakteri Probiotik untuk Pengendalian Penyakit Vibriosis pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). [Disertasi]. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Irianto, A. 2003. Probiotik Akuakultur. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- 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.
- 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.
- Kurniashi, T., Widarni., Mulyasari., Melati, I., Azwar, Z. i., & Lusaaastuti, A. M., 2013. Isolasi, Seleksi dan Identifikasi Bakteri dari Saluran Pencernaan Ikan Lele sebagai Kandidat Probiotik. J. Ris. Akuakultur. 8(2) : 277:286.
- Lee, C.S., C. Lim, D.M. Gatlin III, and C.D. Webster. 2015. Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health. Wiley Blackwell. John Wiley & Sons Inc., New Jersey. 355 p.
- Lilley, D.M & Stillwell R.J. 1965. Probiotics: Growth Promoting Factors Produced By Micro-Organisms. Science. 147: 747–748.
- 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.
- Merrifield, D. and E. Ringo. 2014. Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotic and Prebiotic. Wiley-Blackwell. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, UK. 465 p.

- Mulyati. 2010. Penapisan Bakteri Probiotik untuk Pengendalian Penyakit Streptococcus pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). IPB.Bogor.
- Muthukumar,P & Kandepan, C., 2015. Isolation, Identifikation and Characterization of Probiotic Organism From Intestinal Of fresh Water Fishes. Internationa Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. IV (3): 607-616.
- Nandi, A., G. Banerjee, S. K. Dan, K. Ghosh and A. K. Ray. 2017. Probiotic efficiency of Bacillus sp. in Labeo rohita challenged by *Aeromonas hydrophila*: assessment of stress profile, haemato-biochemical parameters and immune responses. Aquaculture Research: 1-12.
- Nayak SK. 2010. Probiotic and immunity: A fishperspective. Fish and Shellfish Immunology 29: 1- 14.
- Nikoskelainen, S., Salminen S., Bylund G., & Ouwehand A. 2001. Characterization of The Properties of Human and Dairy-Derived Probiotics for Prevention Of Infectious Diseases in Fish. Appl Environ Microbiol. 67: 2430–2435.
- Noga, E. J. 2010. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. Second Edition. Wiley-Blackwell. John Wiley & Sons, Inc. Iowa, USA. 519 p.
- Parthasarathy, R. and Ravi, D. 2011. Probiotic bacteria as growth promoter and biocontrol agent against *Aeromonas hydrophila* in Catla catla (Hamilton, 1822). Indian J. Fish., 58(3): 87-93.
- Reid, G. 1999. The Scientific Basis for Probiotic Galurs of Lactobacillus. Appl Environ Microbiol. 65: 3763-3766.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn S., Piyatiratitivorakul S & Menasaveta P. 2000. Immunity enchacement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a Probiot Bacterium (Bacillus S11). Aquaculture. 191: 271-288.
- Roberts, R.J. 2012. Fish Pathology. 4th ed. Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Ltd., Publications. 597 p.
- Rukyani, A. 1993. Penanggulangan Penyakit Udang Windu (*Penaeus monodon*). Seminar Hasil Penelitian Perikanan Budidaya. 136: 21-29.

- Salminen, S., A. Ouwehand., Y. Benno., Y. K. Lee. 1999. Probiotics: How Should Be Defined? Trends in Food Science and Technology. 10:107 – 110.
- Shao, J.Z., J. Liu and L.X. Xiang. 2004. *Aeromonas hydrophila* Induces Apoptosis in *Carassius auratus* Lymphocytes *In Vitro*. Aquaculture 229: 11-23.
- 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.
- Sornplang, P. and Piyadeatsoostorn, S. 2016. Probiotics Isolates from Unconventional Sources. A review. Journal Of Animal Science and Technology. 58:26.
- 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.
- Sudarsono, A. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri pada Ikan Laut dalam Spesies Ikan Gindara (*Lepidocibium flavobronneum*). Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sukenda, Rahman, dan Hidayatullah, D. 2016. Kinerja Probiotik *Bacillus* spp pada Pendederan Benih Ikan Lele *Clarias* sp yang diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Jurnal Akuakultur Indonesia 15(2): 162- 170.
- Sunarto, Sukenda dan Widanarni. 2010. Penapisan Bakteri Probiotik dari Saluran Pencernaan dan Medai Pemeliharaan Ikan elawat (*Leptobarbus hoeveni* Bleker) Untuk Pengendalian Bakteri Patogen. Journal Akuakultur Indonesia, 2010.
- Talpur, A. D., Munir, M. B, Mary, A. and Hashim, R. 2014. Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead *Channa striata* fingerlings. Aquaculture, 426–427: 14–20.

- Utami, D.A.S., Widanarni, M.A. Suprayudi, 2010. Quality of dried Bacillus NP5 and its effect on growth performance of tilapia (*Oreochromis niloticus*) Pak J Biol Sci, 18 (2) (2015), pp. 88-93.
- Verschuere, L., G. Rombaut., P. Sorgeloos., W. Verstraete. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Jurnal Mircobiol Mol Biol Rev. 64(4): 655-671.
- Vine, N. G., W. D. Laukes., H. Keiser. 2004. In Vitro Growth Characteristics of Five Candidate Aquaculture Probiotics and Two Fish Pathogen Grown In Fish Internal Mucus. FEMS Microbiol Letter. 231(1):145-152.
- Watson, A. K., Kaspar, H., Lategan, M. J., and Gibson, L. 2008. Probiotic in Aquaculture: The Need, Principles and Mecanism of Action and Screening Processes. Science Direct. Aquaculture.272 (2008): 1- 14.
- Yusuf, R. W. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Gram Negatif pada Luka Ikan Maskoki (*Carassius auratus*) Akibat Infeksi Ektoparasit *Argulus* sp. Universitas Erlangga. Surabaya.
- Zhou, S., Zhang, A.,Yin, H. and Chu, W. 2016. Bacillus sp. QSI-1 Modulate Quorum Sensing Signals Reduce *Aeromonashydrophila* Level and Alter Gut Microbial Community Structure in Fish. Front. Cell. Infect. Microbiol. 6:184.