

LAPORAN PENELITIAN

**POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI USUS IKAN
REPANG (*Puntioplites waandersi*) SEBAGAI
PROBIOTIK PADA IKAN**



Dr. Agustina, S.Pi., M.Si.
(NIP 19770804 200312 2 002)

Prof. Dr. drh. Hj. Gina Saptiani, M.Si.
(NIP 19620630 199303 2 001)

Prof. Dr. Esti Handayani Hardi, S.Pi., M.Si
(NIP 19800104 200604 2 003)

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

**UNIVERSITAS MULAWARMAN
SAMARINDA
2021
HALAMAN PENGESAHAN**

Judul Penelitian : Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (*Puntiplites Waandersi*) sebagai Probiotik pada Ikan

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 : Prof. Dr. drh. Hj. Gina Saptiani, M.Si.
 NIP : 19620630 199303 2 001
 Jabatan Fungsional : Guru Besar
 Prodi : Akuakultur
 Email : gina_saptiani@yahoo.com

Nama Lengkap : Prof. Dr. Esti Handayani Hardi, S.Pi., M.Si
 NIP : 19800104 200604 2 003
 Jabatan Fungsional : Guru Besar
 Prodi : Akuakultur
 Email : estie_hardie@yahoo.com

Instansi : Jurusan Budidaya Perairan FPIK Universitas Mulawarman

Lama Penelitian : 4 bulan
 Biaya Penelitian : Rp. 20.000.000,- (Dua puluh juta rupiah)

Samarinda, 8 September 2021

Mengetahui,
 Dekan FPIK Unmul

Ketua Peneliti,

Dr. Ir. Komsanah Sukarti , MP.
NIP 19640510 198903 2 003

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 Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (*Puntioplites Waandersi*) sebagai Probiotik pada Ikan 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. Rektor Universitas Mulawarman, Samarinda.
2. Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman, Samarinda.
3. Anggota tim peneliti yaitu Prof. Dr. drh. Hj. Gina Saptiani, M.Si. dan Prof. Dr. Esti Handayani Hardi, S.Pi., M.Si. yang telah berpartisipasi dalam penelitian ini.
4. Ketua Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Akuatik, FPIK Universitas Mulawarman yang telah memfasilitasi penelitian ini.
5. Ketua dan laboran Laboratorium Bioteknologi Kelautan Tropis Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro yang telah memfasilitasi uji identifikasi biomolekuler.
6. Tenaga laboran di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Akuatik, FPIK Universitas Mulawarman serta adik-adik mahasiswa yang telah membantu dalam penyiapan dan pelaksanaan penelitian di laboratorium.

Samarinda, September 2021

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan.....	3
D. Manfaat.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Biologi dan Sistematika Ikan Repang (<i>Puntiplites waandersi</i>)	5
B. Bakteri Patogen pada Ikan Air Tawar	7
C. Bakteri Asam Laktat dan Manfaatnya Bagi Organisme Akuatik.....	11
D. Penapisan Bakteri Asam Laktat sebagai Kandidat Probiotik.....	12
BAB III. METODE PENELITIAN	14
A. Waktu dan Tempat	14
B. Bahan dan Alat.....	14
C. Kerangka Alur Penelitian.....	16
D. Desain Penelitian.....	16
E. Prosedur Penelitian.....	18

1.	Tahap Persiapan	18
2.	Tahap Pelaksanaan	18
	a. Isolasi bakteri asam laktat dari usus ikan repang.....	18
	b. Karakterisasi biokimia isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang.....	19
	c. Uji antibakterial bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap bakteri patogen	19
	d. Uji sensitivitas bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap antibiotik	20
	e. Uji toleransi bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap media yang berbeda.....	20
	f. Uji aktivitas enzim isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang.....	21
	g. Uji identifikasi biomolekuler isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang.....	23
F.	Pengumpulan Data	25
G.	Analisis Data	26
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....		27
A.	Jenis Bakteri asam laktat dari Usus Ikan Repang	27
B.	Aktivitas Antibakterial Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang terhadap Bakteri Patogen.....	30
C.	Sensitivitas Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang terhadap Antibiotik	31
D.	Toleransi isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap beberapa media	33
E.	Aktivitas Enzimatis Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus	
F.	Ikan Repang.....	35
G.	Identifikasi Biomolekuler Isolat Bakteri dari Usus Ikan Repang	37
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN		42
A.	Kesimpulan.....	42
B.	Saran.....	42
DAFTAR PUSTAKA		43
LAMPIRAN.....		53

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1. Kategori Zona Hambat terhadap Pertumbuhan Bakteri.....	26
3.2. Diameter Zona Hambat Beberapa Antibiotik	26
4.1. Karakteristik Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang.....	28
4.2. Rata-Rata Diameter zona hambat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang terhadap Bakteri Patogen (mm)	31
4.3. Rata-Rata Diameter zona hambat pada Uji Sensitivitas Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang Terhadap Beberapa Jenis Antibiotik (mm)..	32
4.4. Rata-Rata Nilai Densitas Optik (OD) Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang pada Media dengan Kadar Ph dan Garam Empedu Berbeda.....	33
4.5. Rata-Rata Nilai Densitas Optik (OD) Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang pada Media dengan Suhu dan Kadar Garam Berbeda.....	34
4.6. Rata-Rata Indeks Hidrolisis Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang	36
4.7. Hasil Identifikasi Molekuler Tiga Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang	37
4.8. Fasta Sekuens DNA Bakteri Usus Ikan Repang.....	38

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1. Ikan repang (<i>P. waandersi</i>) (Sumber: dokumen pribadi, 2021).....	6
3.1. Kerangka alur penelitian ‘Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (<i>P. waandersi</i>) sebagai Probiotik pada Ikan’	17
4.1. Morfologi koloni isolat bakteri asam laktata dari usus ikan repang (<i>P. waandersi</i>)	27
4.2. Aktivitas antibakterial bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap bakteri patogen.	30
4.3. Sensitivitas isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang (<i>P. waandersi</i>) terhadap antibiotik.....	32
4.4. Zona bening yang dihasilkan pada uji aktivitas enzimatis bakteri asam laktat dari usus ikan repang.....	36

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Rata-rata diameter zona hambat pada uji sensitivitas bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap beberapa jenis antibiotik (mm).....	54
2. Dokumentasi penelitian.....	54
3. RAB Penelitian ‘Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (<i>P. waandersi</i>) sebagai Probiotik pada Ikan	59

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kegiatan budidaya ikan di sepanjang Sungai Mahakam Provinsi Kalimantan Timur semakin berkembang sejalan dengan meningkatnya kebutuhan masyarakat akan sumber pangan dari protein hewani dengan harga yang terjangkau. Ikan mas (*Cyprinus carpio*), nila (*Oreochromis niloticus*), dan ikan patin (*Pangasius* sp.) merupakan komoditi yang paling banyak dibudidayakan di daerah ini, terutama di dalam keramba. Selain ketiga jenis ikan tersebut, masyarakat pun menyukai jenis-jenis ikan lokal yang banyak ditemukan hidup di Sungai Mahakam dan danau-danau di sekitarnya, diantaranya ikan repang (*Puntioplites waandersi*) yang termasuk dalam kelompok ikan Cyprinids. Berdasarkan kebiasaan makanannya ikan repang digolongkan sebagai ikan omnivora atau ada kecenderungan untuk makan beragam jenis makanan. Menurut Utomo *et al.* (2010) pakan alami ikan repang atau cipuk adalah tumbuhan, benthos, serangga dan alga dasar.

Penyakit bakterial merupakan masalah utama yang dihadapi oleh para petani ikan di daerah ini. Bakteri yang dominan ditemukan pada ikan yang sakit maupun ikan yang sehat adalah bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. (Hardi and Pebrianto, 2012; Agustina *et al.*, 2014). Kedua jenis bakteri ini termasuk dalam golongan bakteri fakultatif. Keberadaannya dalam tubuh organisme akuatik, di air maupun sedimen tidak bisa diabaikan terutama pada saat kondisi lingkungan perairan mengalami penurunan akibat perubahan suhu air ataupun masuknya limbah organik ke dalam air. Kualitas air yang menurun akan berdampak pada menurunnya respon imunitas ikan dan di sisi lain memicu perkembangan bakteri fakultatif yang ada di dalam wadah budidaya (Plump and Hanson, 2011; Verma and Gupta, 2015; Sunitha and Krishna, 2016). Mortalitas pada ikan yang diinfeksi oleh kedua bakteri ini cukup tinggi, yaitu mencapai 50-80% (Hardi *et al.*, 2014; Agustina *et al.*, 2019). Bakteri

patogen lain yang kerap menjadi penyebab penyakit pada ikan budidaya air tawar seperti golongan catfish dan nila adalah bakteri *Edwardsiella ictaluri*. Bakteri *E. ictaluri* ditemukan menginfeksi ikan catfish seperti lele (*Clarias sp.*) dengan gejala spesifik berupa luka sampai berlubang (ulcer) pada bagian kepala dengan mortalitas mencapai 50% (Keskin *et al.*, 2004).

Upaya pengendalian penyakit bakterial pada ikan sudah lama dilakukan dan semakin berkembang. Probiotik merupakan satu diantara alternatif yang sudah dikembangkan dalam pengendalian penyakit pada kegiatan akuakultur, terutama yang berkaitan dengan infeksi bakteri (Nayak, 2010; Merrifield and Ringo, 2014; Iwashita *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015; Hasan and Banerjee, 2020). Bakteri asam laktat yang berasal dari usus ikan merupakan jenis bakteri probiotik yang sudah terbukti mampu meningkatkan kesehatan ikan melalui pemanfaatan nutrisi, bersifat antibakterial maupun peningkatan respon imunitasnya dalam menghadapi infeksi patogen. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kelompok bakteri asam laktat menunjukkan aktivitas antibakterial secara *in vitro* seperti pada ikan nila (Zapata and Lara-Flores, 2013), ikan rainbow trout (Balcazar *et al.*, 2008), ikan mas (Kaktcham *et al.*, 2017), beberapa jenis ikan air tawar lain (Hanol *et al.*, 2020), maupun pada ikan air laut (Alonso *et al.*, 2019). Adapun jenis bakteri asam laktat yang menunjukkan potensi sebagai probiotik pada ikan antara lain *Lactococcus lactis*, *Enterococcus spp*, *Lactobacillus plantarum*, dan *Leuconostoc mesenteroides*.

Potensi ikan lokal sebagai sumber bakteri probiotik perlu diteliti mengingat keberadaan jenis ikan ini masih melimpah di perairan Sungai Mahakam dan danau di sekitarnya. Pada ikan kelabau (*Osteochilus melanopleura*) sudah ditemukan beberapa bakteri yang berpotensi sebagai probiotik pada ikan (Agustina *et al.*, 2018; Agustina *et al.*, 2019). Berdasarkan hal tersebut maka penelitian tentang potensi bakteri asam laktat yang berasal dari usus ikan rejang perlu dilakukan. Uji aktivitas antibakterial secara *in vitro*, toleransi terhadap beberapa media dan aktivitas enzimatis yang dilakukan pada penelitian ini sebagai tahap awal dari kegiatan penapisan bakteri kandidat probiotik pada ikan rejang.

B. Rumusan Masalah

Infeksi bakteri pada ikan budidaya di sekitar Sungai Mahakam Kabupaten Kutai Kartanegara Provinsi Kalimantan Timur berakibat pada kematian ikan dan menjadi masalah bagi para pembudidayanya. Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk menjawab beberapa hal sebagai berikut:

1. Jenis bakteri asam laktat apa saja yang bisa diisolasi dari usus ikan repang?
2. Apakah bakteri asam laktat dari usus ikan repang mampu bersifat antibakterial secara *in vitro* terhadap bakteri patogen *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp. dan *Edwardsiella ictaluri*?
3. Apakah bakteri asam laktat dari usus ikan repang memiliki mempunyai toleransi pada media tanam berbeda dan aktivitas enzimatis secara *in vitro*?

C. Tujuan

Penelitian ‘Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (*P. waandersi*) sebagai Probiotik pada Ikan’ dilaksanakan dengan tujuan sebagai berikut:

1. Menganalisis dan menemukan jenis bakteri asam laktat dari usus ikan repang.
2. Menganalisis dan menemukan bakteri asam laktat dari usus ikan repang yang bersifat antibakterial terhadap bakteri patogen *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp. dan *E. ictaluri* secara *in vitro*.
3. Menganalisis dan menemukan bakteri asam laktat dari usus ikan repang mempunyai toleransi pada media tanam berbeda dan aktivitas enzimatis secara *in vitro*.

D. Manfaat

Penelitian potensi bakteri asam laktat dari usus ikan repang sebagai kandidat probiotik pada ikan diharapkan dapat memberi manfaat antara lain:

1. Dapat memberi informasi mengenai jenis bakteri asam laktat dari usus ikan repang 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 budidaya.
3. Memberikan manfaat bagi masyarakat dan dunia usaha dalam pengembangan dan pemanfaatan produk berupa bakteri probiotik yang berasal dari usus ikan repang.
4. Memberikan manfaat bagi masyarakat di perairan Sungai Mahakam dan sekitarnya mengenai pentingnya upaya konservasi ikan-ikan lokal di daerah ini.

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 rejang 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 rejang di Sungai Batanghari mulai dari Pulau Musang hingga Muara Sabak. Makanan utamanya adalah tumbuhan dan zoobentos, makanan pelengkap adalah serangga, sedangkan makanan tambahan berupa plankton dan cacing (Kaban *et al.*, 2016), namun menurut Utomo *et al.* (2010) pakan alami ikan rejang atau cipuk adalah tumbuhan, benthos, serangga dan alga dasar.



Gambar 2.1. Ikan rejang (*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. 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 (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 metabolismenya 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 *eksophtalmia*, 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 Cellular Product) dan ICP (Intra Cellular Product) mampu menyebabkan perubahan patologi anatomi ikan nila dan kematian setelah diinjeksikan pada ikan tersebut.

Bakteri *Edwardsiella ictaluri* merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit yang cukup serius dan banyak menyerang budidaya terutama ikan patin *Pangasius* sp.), selain itu juga bisa menginfeksi ikan lele (*Clarias batrachus*) yang disebut sebagai penyakit *Enteric Septicemia of Catfish* (ESC). Kematian ikan patin akibat infeksi bakteri *E. ictaluri* menjadi penghambat keberhasilan produksi budidaya. Di Indonesia dilaporkan, *E. ictaluri* pertama kali ditemukan telah menginfeksi ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) di Provinsi Jambi pada bulan Januari 2002 (Panigoro *et al.*, 2005).

E. ictaluri adalah bakteri fakultatif anaerob, berbentuk batang, gram negatif termasuk famili Enterobacteriaceae, non-spora, motil, katalase positif, oksidase negatif, fermentasi glukosa (Keskin *et al.*, 2004). Karakteristik biokimia *E. ictaluri* pertama kali digambarkan oleh Hawke *et al.* (1981) dan dipelajari lebih lanjut oleh Waltman *et al.* (1986) dengan menguji 119 isolat *E. ictaluri* dan ditemukan 100% positif dalam pengujian metil red, nitrat reduktase, lisin dekarbosisilase, ornithin dekarbosisilase, dan katalase. Selain itu, hasil pengujian menyatakan 100% negatif

dalam pengujian sitrat, malonat, Voges Proskauer, phenylalanin, indol, arginin dihidrolase, sitokrom oksidase, α -galactosidase, dan hydrolyzing urea. Karakteristik dari *E. ictaluri* adalah bergerak dengan flagella, tidak berspora, dan tidak berkapsul, batang, pleomorfik, Gram negatif, berukuran 0,75-2,5 μm , koloni kecil, bulat transparan, tidak berwarna, suhu optimum 28°C-30°C (Holt *et al.*, 1994).

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 $3,23 \times 10^7$ cfu/mL (Purwaningsih *et al.*, 2019).

C. 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*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, dan *Vagococcus* (Ringo, *et al.*, 2018).

D. 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.*, 2018) 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).

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ‘Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (*P. waandersi*) sebagai Probiotik pada Ikan’ dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan Juni 2021. Uji secara *in vitro* dan identifikasi biokimia dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Akuatik Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman, dan uji identifikasi biomolekuler dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Kelautan Tropis Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro.

B. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan untuk menunjang penelitian ‘Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (*P. waandersi*) sebagai Probiotik pada Ikan’ adalah sebagai berikut:

1. Sampel isi usus ikan repang digunakan sebagai sumber isolat bakteri kandidat probiotik diambil dari saluran pencernaan, mulai dari kerongkongan sampai anus. Ikan repang 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*, *Pseudomonas* sp. dan *E. ictaluri* merupakan koleksi dan Laboratorium MBA FPIK Universitas Mulawarman.
3. Isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang 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 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. Amilum, minyak zaitun dan susu skim digunakan untuk uji aktivitas enzim isolat bakteri asam laktat.
8. NaCl, fresh bile salt (empedu sapi yang segar), NaOH dan HCl untuk uji toleransi terhadap garam, garam empedu, dan pH media.
9. 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 laktata dari usus ikan repang.
10. Tissue dan alkohol 70% untuk sterilisasi.

Alat-alat yang digunakan untuk menunjang penelitian ‘Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (*P. waandersi*) sebagai Probiotik pada Ikan’ adalah sebagai berikut:

1. Laminar air flow digunakan saat preparasi bakteri.
2. Dissecting set (alat bedah) digunakan untuk preparasi usus ikan Kelabau 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. PCR, Elektroforesis mini-gel, UV Transluminator digunakan pada identifikasi molekular isolat bakteri.
6. Mikroskop merk Olympus BX41 digunakan saat pengamatan bakteri.
7. Kamera untuk mendokumentasikan kegiatan penelitian.

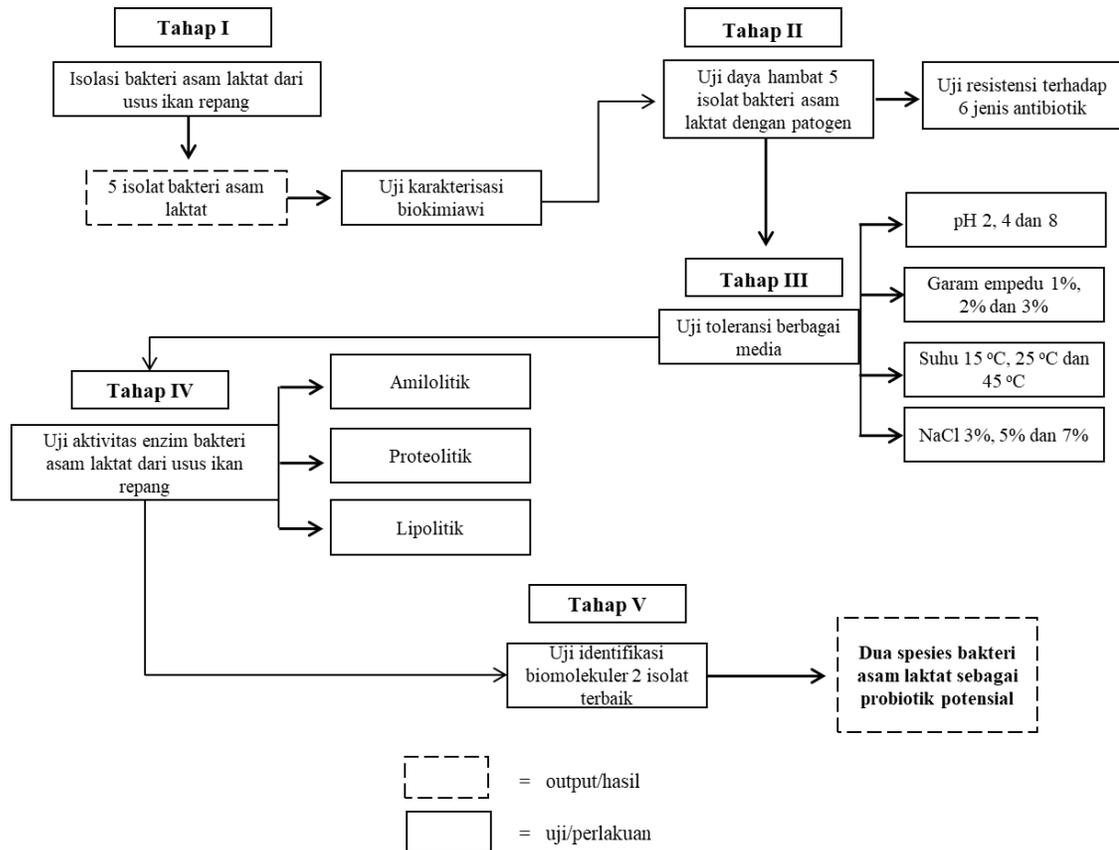
C. Kerangka Alur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu: Tahap I isolasi dan karakterisasi atau identifikasi isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang secara biokimia. Tahap II uji daya hambat isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap bakteri patogen secara *in vitro* dan sensitivitas terhadap antibiotik. Tahap III uji toleransi isolat bakteri asam laktat terhadap pH media, kadar garam (NaCl), garam empedu dan suhu media. Tahap IV uji aktivitas enzimatis isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang. Tahap V uji identifikasi biomolekuler dua isolat bakteri asam laktat terbaik yang berpotensi sebagai probiotik. Kerangka alur penelitian dijabarkan pada Gambar 3.1.

D. Desain Penelitian

Pada penelitian ‘Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (*P. waandersi*) sebagai Probiotik pada Ikan’ 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 karakterisasi biokimia isolat tersebut. Uji ini menggunakan desain survey dengan mengeksplorasi sepuluh sampel usus ikan repang untuk mendapatkan isolat murni bakteri asam laktat.



Gambar 3.1. Kerangka alur penelitian ‘Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Rewang (*P. waandersi*) sebagai Probiotik pada Ikan’

2. Uji daya hambat secara *in vitro* isolat bakteri asam laktat dari usus ikan rewang terhadap bakteri patogen (*A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp. dan *E. ictaluri*). 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). 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 toleransi terhadap pH media, kadar garam (NaCl), garam empedu dan suhu media isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang menggunakan desain ekperimental laboratorium dengan lima perlakuan dan tiga ulangan.
4. Uji aktivitas enzimatis isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang menggunakan desain ekperimental laboratorium dengan lima perlakuan dan tiga ulangan.
5. Uji identifikasi biomolekuler isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang menggunakan desain survey dengan mengeksplorasi dua isolat terbaik dari tahapan uji sebelumnya.

E. Prosedur Penelitian

Penelitian ‘Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (*P. waandersi*) sebagai Probiotik pada Ikan’ dilakukan beberapa tahap meliputi persiapan dan pelaksanaan, seperti diuraikan di bawah ini:

1. Tahap Persiapan

Ikan repang 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 repang

Bakteri asam laktat diisolasi dari sepuluh ekor ikan repang 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 sepuluh ekor ikan repang 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 °C. 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 °C untuk uji selanjutnya (Hanol *et al.*, 2018; Patel *et al.*, 2020).

b. Karakterisasi biokimia isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang

Lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan kelabau 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 aktivitas antibakterial bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap bakteri patogen

Bakteri asam laktat yang diisolasi dari usus ikan repang diuji kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *A. hydrophila*, *Pseudomonas sp.*, dan *E. ictaluri* dengan metode difusi dan dilakukan

dengan tiga ulangan (modifikasi dari Hanol *et al.*, 2018). Biakan cair *A. hydrophila*, *Pseudomonas sp.*, *E. ictaluri* 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*, *Pseudomonas sp.*, dan *E. ictaluri* 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 diletakkan di atas media MRSB yang masing-masing sudah ditanam *A. hydrophila*, *Pseudomonas sp.*, dan *E. ictaluri*. 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*, *Pseudomonas sp.*, dan *E. ictaluri*.

d. Uji sensitivitas bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap antibiotik Pada uji ini digunakan teknik difusi (Patel *et al.*, 2020). Lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dinokulasikan ke dalam media MRSB 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 °C.

e. Uji toleransi bakteri asam laktat dari usus ikan repang 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.

Kemampuan isolat untuk tumbuh pada media dengan suhu yang berbeda diuji pada suhu 15 °C, 25 °C, dan 45 °C selama 24 jam. Biakan lima isolat bakteri asam laktat sebanyak 1 mL diinokulasikan ke dalam 9 mL MRSB kaldu dan diinkubasi semalaman pada suhu 37°C, selanjutnya diinokulasikan pada 9 mL media MRSB sebanyak 1 mL dan diinkubasi kembali pada suhu 15 °C, 25 °C, dan 45 °C selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri diamati dengan menilai kekeruhan (densitas optik) dengan menggunakan spektrofotometer 600 nm (modifikasi dari Risna *et al.*, 2020).

f. Uji aktivitas enzim isolat bakteri asam laktat dari usus ikan re pang

Pada uji aktivitas enzim amylase atau aktivitas amilolitik, lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan re pang diinokulasi pada media MRSA yang mengandung amilum 1% (Fossi *et al.*, 2005; modifikasi dari Benson, 2001). Media MRSA ditambahkan sebesar 1% amilum lalu media tersebut dimasukkan ke dalam cawan petri. Isolat bakteri asam laktat diinokulasi ke dalam media MRSB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Biakan yang sudah berumur 24 jam tersebut kemudian diteteskan ke paper disk steril lalu diletakkan di media MRSA yang sudah mengandung amilum 1%. Biakan lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Pengamatan zona bening di sekitar koloni dilakukan dengan penambahan lugol pada media.

Pada uji aktivitas proteolitik atau aktivitas enzim protease dilakukan dengan menggunakan 1% susu skim dalam media MRSA (Nespolo *et al.*, 2010; modifikasi dari Benson, 2001). Isolat bakteri asam laktat diinokulasi ke dalam media MRSB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Biakan yang sudah berumur 24 jam tersebut kemudian diteteskan ke paper disk steril lalu diletakkan di media MRSA yang sudah mengandung susu skim 1%. Biakan lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Aktivitas proteolitik diamati berdasarkan zona bening di sekitar paper disk.

Pada uji aktivitas lipolitik atau aktivitas enzim lipase dilakukan dengan penambahan 2 mL minyak zaitun dalam 100 mL media MRSA. Biakan cair isolat bakteri asam laktat yang sebelumnya sudah diinkubasi dalam media MRSB selama 24 jam diteteskan pada paper disk steril lalu diletakkan di atas media MRSA yang sudah mengandung minyak zaitun, biakan lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Aktivitas lipolitik dari bakteri asam laktat ditandai dengan zona bening di sekitar koloni yang menunjukkan bahwa media larut dan terhidrolisis (modifikasi dari Benson, 2001).

g. Uji identifikasi biomolekuler isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang

Identifikasi lima isolat bakteri asam laktat yang bersifat antibakterial secara *in vitro* dilakukan dengan Analisis Gen 16S rRNA. Tahapan identifikasi diuraikan sebagai berikut:

1. Ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan Kit Chelex 100. Sel bakteri yang telah ditumbuhkan selama 24 jam dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 ml yang berisi 100 μ l aquabides, kemudian ditambahkan 1 ml saponin 0,5% dan didiamkan selama 24 jam pada suhu 4 $^{\circ}$ C. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, supernatan hasil sentrifugasi dibuang. Sebanyak 1 ml *Phosphate Buffer Saline* (PBS 1x) ditambahkan ke dalam mikrotube 1,5 ml, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit, supernatan hasil sentrifugasi dibuang. Selanjutnya sebanyak 100 μ l akuabides dan 50 μ l Chelex 100 ditambahkan ke dalam tabung. Sampel ditaruh dalam *heating block* selama 10 menit (sampel divortex pada 5 menit pertama). Sentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang mengandung DNA dipindahkan ke dalam mikrotube 1,5 ml yang baru dan siap untuk proses amplifikasi DNA.

2. Amplifikasi dan Visualisasi DNA. Amplifikasi DNA menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) 16S rRNA. Perlakuan temperatur yang digunakan pada proses amplifikasi DNA adalah Pre - denaturasi pada suhu 95 $^{\circ}$ C selama 1 menit, kemudian sebanyak 35 siklus - denaturasi pada suhu 95 $^{\circ}$ C selama 15 detik, annealing pada suhu 55 $^{\circ}$ C selama 15 detik. Ekstensi pada suhu 72 $^{\circ}$ C selama 10 detik dan final ekstensi pada suhu 72 $^{\circ}$ C selama 5 menit. Primer yang digunakan untuk PCR 16S rRNA adalah primer universal untuk bakteri 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer spesifik *eubacteria* 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Campuran bahan-

bahan yang digunakan yaitu Bioline HS Red Mix (12,5 µl), primer 27 F (1,0 µl), primer 1492 R (1,0 µl), DNA *template* (2,5 µl) dan aquabides (8,5 µl) sehingga total volume 25 µl. Bahan-bahan tersebut dicampur dalam *microtube* PCR.

Visualisasi produk PCR 16S rRNA ini dilakukan melalui elektroforesis dengan cara memasukkan 5 µl produk PCR ke dalam sumur gel agarose 1 % yang telah direndam larutan buffer TAE 1 X. Produk PCR dimasukkan dalam sumur gel dengan mencantumkan *Ladder* pada sumur pertama sebagai penanda. Gel kemudian dielektroforesis dengan voltase sebesar 100 V selama ± 30 menit. Setelah elektroforesis, gel direndam *Ethidium Bromide* selama 10 menit untuk memberikan warna pada pita DNA yang terperangkap pada gel. Terakhir, pita hasil PCR dapat dilihat dengan menggunakan alat *Gel Doc*.

3. Sekuensing DNA. Sekuensing dilakukan menurut siklus PCR sekuensing menggunakan *Big Dye Terminator v.3.1*. Formula untuk reaksi PCR sekuensing yaitu: 2 µl *big dye*, 2 µl *buffer* 10x, 4 µl *template* DNA, 1 µl primer dengan konsentrasi 3,2 pmol, ddH₂O hingga volume akhir 10 µl. Amplifikasi DNA dilakukan dengan siklus sebagai berikut: denaturasi awal (96 °C selama 2 menit), kemudian denaturasi (96 °C selama 10 detik); annealing (50 °C selama 5 detik); dan ekstensi (60 °C selama 4 menit) sebanyak 25 siklus. Hasil PCR dipurifikasi dan disekuen menggunakan primer 27F dan 1492 R. Sekuen dianalisis secara otomatis (ABI 3130XL, *Applied Biosystem*).

4. Analisis Homologi. Analisis sekuen DNA isolat bakteri terbaik kemudian dibandingkan dengan sekuen DNA pada basis data (*database*) DNA. Penelusuran dilakukan dengan menggunakan internet melalui program pelacakan database *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada *Natonal Center for Biotechnology Information, National Institute for Health, USA*, data penelitian yang diperoleh selanjutnya dianalisa dengan

menggunakan metode deskriptif. Hasil sekuensing dianalisis menggunakan BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

F. Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan pada penelitian ‘Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (*P. waandersi*) sebagai Probiotik pada Ikan’ adalah sebagai berikut:

1. Karakter lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang, 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. Kemampuan daya hambat isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap bakteri patogen diukur berdasarkan luas zona bening di sekitar paper disk yang mengandung bakteri asam laktat (mm).
3. Sensitivitas bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap enam jenis antibiotik diukur berdasarkan luas zona bening di sekitar paper disk antibiotik (mm).
4. Kemampuan toleransi isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang pada media yang berbeda diukur dengan nilai densitas optik pada pengukuran dengan spektrofotometer 600 nm.
5. Aktivitas enzimatik (hidrolisis) bakteri asam laktat dari usus ikan repang diukur berdasarkan luas zona bening di sekitar paper disk yang mengandung bakteri asam laktat pada media ditambahkan dengan amilum, susu skim dan minyak zaitun (mm). Indeks hidrolisis dapat diketahui berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk pada media tersebut. Menurut Melliawati *et al.*, (2015) indeks hidrolisis ditentukan dengan rumus:

$$\text{Indeks hidrolisis} = \frac{\text{diameter zona bening}}{\text{diameter koloni bakteri}}$$

6. Spesies dua bakteri asam laktat dari usus ikan kelabau hasil identifikasi biomolekuler dengan Analisis Gen 16S rRNA

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 Kelabau 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

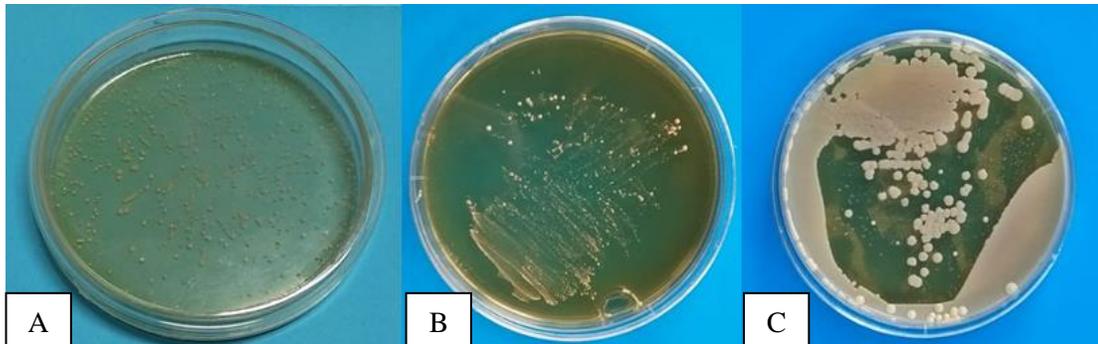
Sumber: Mayer (2007)

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Jenis Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang

Pada isolasi bakteri asam laktat dari usus ikan repang diperoleh lima isolat, yaitu R1, R2, R3, R4 dan R5. Kelima isolat tersebut selanjutnya dikarakterisasi morfologi koloni, sel dan biokimiawi seperti yang dicantumkan pada Tabel 4.1. Berdasarkan uji karakteristik morfologi koloni, sel dan biokimiawi pada usus ikan repang berhasil diisolasi tiga genus bakteri asam laktat yaitu *Enterococcus*, *Lactococcus* dan *Lactobacillus* (Holt *et al.*, 1994). Dua isolat bakteri dari usus ikan repang termasuk dalam genus *Enterococcus* yaitu isolat R1 dan R2, R3 termasuk dalam genus *Lactobacillus*, dua isolat lain masuk dalam genus *Lactococcus* yaitu isolat R4 dan R5 (Tabel 4.1).



Gambar 4.1. Morfologi koloni isolat bakteri asam laktata dari usus ikan repang (*P. waandersi*): (A) isolat R2, (B) isolat R3 dan (c) isolat R5

Ketiga jenis bakteri asam laktat tersebut yaitu *Enterococcus*, *Lactococcus* dan *Lactobacillus* memang umum ditemukan pada saluran pencernaan ikan, baik ikan air laut maupun ikan air tawar. Feliatra *et al.* (2004), menemukan beberapa bakteri yang berhasil diisolasi dari pencernaan ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) terdapat jenis bakteri asam laktat dari genus *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* dan *Lactococcus*. Pada saluran pencernaan ikan bawal bintang (*Trachinotus blochii*) ditemukan dua isolat yaitu B7-P4-K2

dan B8-P4-K1 termasuk genus *Lactobacillus* dan dan isolat B8-P4-K3 dan 10-P4-K1 merupakan genus *Enterococcus* (Irwansyah *et al.*, 2018). Kumar *et al.*, (2013), juga melakukan isolasi bakteri asam laktat genus *Lactobacillus* sp pada 5 ekor ikan air tawar dan hasilnya terdapat bakteri asam laktat genus *Lactobacillus* sp. pada semua ikan sampel, Vijayaram *et al.* (2016) juga menemukan beberapa isolat *Lactobacillus* spp. pada ikan saluran pencernaan air tawar. Hal serupa juga ditemukan oleh Wulandari *et al.*, (2015) yang mendapatkan jenis bakteri asam laktat yaitu *Bacillus*, *Lactobacillus* dan *Eubacterium* pada saluran pencernaan ikan lele.

Tabel 4.1. Karakteristik Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang

Karakteristik	Isolat Bakteri				
	R1	R2	R3	R4	R5
Bentuk koloni	Bundar	Bundar	Bundar	Bundar	Bundar
Warna koloni	Putih	Putih	Putih susu	Putih susu	Putih susu
Elevasi	Cembung	Cembung	Cembung	Cembung	Cembung
Tepian	Rata	Rata	Rata	Rata	Rata
Bentuk sel	Bulat	Bulat	Batang	Bulat	Bulat
Tipe pergandengan sel	Streptokokus	Streptokokus	Diplobasil	Diplokokus	Streptokokus
Gram	+	+	+	+	+
Motilitas	+	+	-	-	-
Katalase	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+
Metil-Red	+	+	+	+	+
Fermentasi karbohidrat:					
Glukosa	+	+	+	+	+
Sukrosa	+	+	+	+	+
Laktosa	+	+	+	+	+
Produksi H ₂ S	-	-	-	-	-
Produksi gas	-	-	-	-	-
Genus	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus</i>

Karakteristik bakteri asam laktat genus *Enterococcus* yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan repang yaitu, morfologi sel berbentuk bulat berantai, gram positif terhadap pewarnaan, bereaksi negatif terhadap uji katalase, non-motil dan

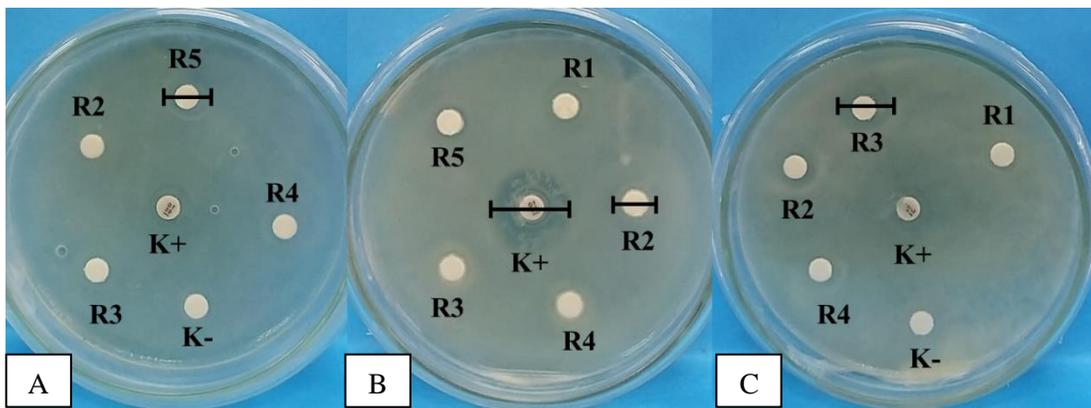
memproduksi asam dari fermentasi karbohidrat jenis laktosa. Hasil ini sejalan dengan pernyataan Holt *et al.* (1994), yang menyebutkan bahwa *Enterococcus* sp. memiliki bentuk sel bulat berantai dan berpasangan pada sebagian spesies, gram positif, katalase negatif serta menghasilkan asam laktat pada media gula laktosa, dan habitat *Enterococcus* sp sendiri yaitu banyak terdapat pada saluran pencernaan hewan.

Karakteristik morfologi koloni bakteri asam laktat genus *Lactobacillus* yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan repang yaitu Hasil ini sejalan dengan pernyataan Suciati *et al.*, (2016), yang menyebutkan bahwa *Lactobacillus* sp memiliki bentuk koloni bulat berwarna putih/ putih susu, elevasi cembung, gram positif, dan sel berbentuk batang. Selain itu dari hasil uji fermentasi gula-gula, *Lactobacillus* sp yang ditemukan pada saluran pencernaan ikan repang, memiliki kemampuan untuk memfermentasikan berbagai macam jenis gula menjadi asam, yang ditunjukkan dengan berubahnya warna dasar (merah) media gula menjadi warna kuning. Perubahan ini mengindikasikan terjadinya perubahan pH media karbohidrat menjadi lebih asam. Karakteristik bakteri *Lactobacillus* menurut Holt *et al.*, (1994) yaitu bentuk koloni bulat berwarna putih dengan permukaan cembung (*Convex*) serta tepian rata (*Entire*), sel biasanya berbentuk batang panjang, terkadang juga berbentuk pendek, tipe pergandengan sel umumnya rantai pendek, gram positif, katalase negatif, oksidase positif, tidak motil oleh flagel peritrichous, fakultatif anaerob tapi tumbuh lebih baik pada tekanan oksigen rendah, tumbuh optimum pada suhu 30-40 °C, dapat dijumpai pada tumbuhan dan hewan.

Karakteristik genus *Lactococcus* yang ditemukan pada usus ikan repang sebagai bakteri gram negative, non motildan mampu memfermentasi karbohidrat dengan dihasilkannya asam laktat, tanpa menghasilkan gas sesuai dengan karakter genus ini menurut Holt *et al.* (1994). Spesies dari *Lactococcus* telah ditemukan di saluran pencernaan ikan nila (*O. niloticus*) dan mampu memfermentasi limbah dari buangan industri pertanian (Patel *et al.*, 2020).

B. Aktivitas Antibakterial Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang terhadap Bakteri Patogen

Lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang, yaitu R1, R2, R3, R4 dan R5 menunjukkan aktivitas antibakterial yang berbeda terhadap tiga bakteri patogen yaitu *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp., dan *E. ictaluri* (Gambar 4.2 dan Tabel 4.2). Ukuran rata-rata diameter zona hambat seluruh isolat bakteri asam laktat terhadap ketiga patogen tersebut berkisar antara 10-15.33 mm. Kisaran diameter zona hambat 10-20 mm termasuk dalam kategori kuat menurut Davis dan Stout (1971).



Gambar 4.2. Aktivitas antibakterial bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap bakteri patogen: (A) *A. hydrophila*, (B) *Pseudomonas* sp., (C) *E. ictaluri*

Isolat bakteri R5 menunjukkan ukuran rata-rata zona hambat paling besar terhadap bakteri *A. hydrophila* yaitu sebesar 15,33 mm dan isolat R4 menunjukkan zona hambat paling kecil sebesar 11,00 mm. Ukuran rata-rata zona hambat terbesar terhadap bakteri *Pseudomonas* sp. ditunjukkan oleh isolat R2 sebesar 13,67 mm dan isolat R1 menunjukkan diameter zona hambat terkecil yaitu 10,00 mm. Isolat R3 menunjukkan ukuran rata-rata zona hambat terbesar terhadap bakteri *E. ictaluri* sebesar 14,00 mm dan R2 sebesar 11,00 mm sebagai isolat dengan zona hambat paling kecil. Adapun kemampuan daya hambat atau aktivitas antibakterial terhadap ketiga bakteri patogen tersebut paling besar ditunjukkan oleh isolat R5 dengan ukuran

rata-rata zona hambat sebesar 13,66 mm, diikuti oleh R3 sebesar 12,56 mm dan R2 sebesar 12,33 mm (Tabel 4.2).

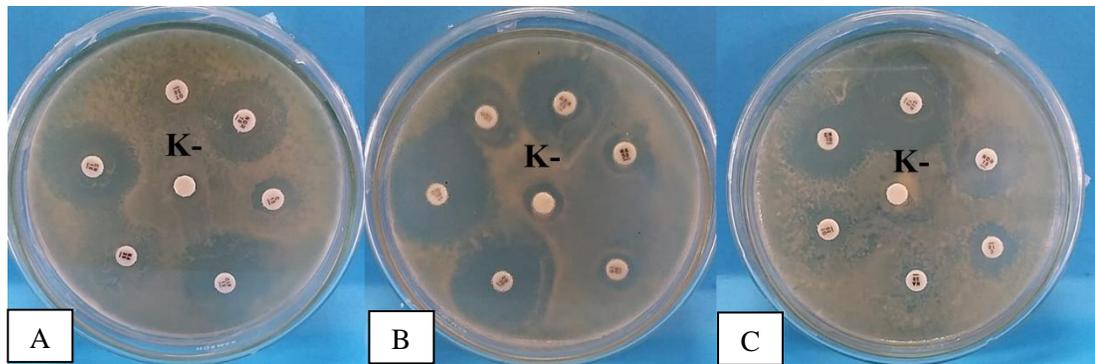
Hanol *et al.* (2020) menemukan 25 isolat bakteri asam laktat pada beberapa ikan air tawar yang mampu menghambat bakteri patogen dengan kisaran zona hambat lemah sampai sangat kuat. Isolat yang terbaik selanjutnya diidentifikasi sebagai bakteri dari genus *Lactobacillus* dan *Lactococcus*. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan pada ikan repang, genus *Lactococcus*, *Enterococcus* dan *Lactobacillus* menunjukkan aktivitas antibakteri yang berada pada kisaran kuat. Isolat bakteri asam laktat sebanyak 49 isolat dari usus ikan gupi (*Poeciliareticulata*) juga menunjukkan aktivitas antibakterial yang kuat setelah diuji dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) secara *in vitro* (Jahangiri *et al.*, 2018). Uji secara *in vitro* isolat bakteri asam laktat dari usus dan insang ikan nila pun menunjukkan hasil yang sejalan dengan penelitian ini, dengan ditemukannya bakteri asam laktat *Enterococcus faecalis* yang memiliki kemampuan antibakterial terhadap beberapa patogen pada ikan (Prachom *et al.*, 2020).

Tabel 4.2. Rata-Rata Diameter zona hambat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang terhadap Bakteri Patogen (mm)

Isolat	Bakteri Patogen			Rata-rata
	<i>A. hydrophila</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>E. ectaluri</i>	
R1	11,67	10,00	11,33	11,00
R2	12,33	13,67	11,00	12,33
R3	12,00	11,67	14,00	12,56
R4	11,00	12,67	13,00	12,22
R5	15,33	12,33	13,33	13,66
K+	17,00	19,00	16,00	17,33
K-	8,00	6,00	7,00	7,00

C. Sensitivitas Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang terhadap Antibiotik

Isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang menunjukkan tingkat sensitivitas yang berbeda terhadap beberapa jenis antibiotik pada penelitian ini (Gambar 4.3 dan Tabel 4.3). Berdasarkan Mayer (2007), sensitivitas isolat bakteri



Gambar 4.3. Sensitivitas isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang (*P. waandersi*) terhadap antibiotik: (A) isolat R1, (B) isolat R4, (C) isolat R5

terhadap antibiotik dikategorikan dalam tiga kelompok, yaitu kisaran zona hambat ≤ 13 mm sebagai resisten, 14-18 sebagai intermediet dan ≥ 19 mm sebagai rentan atau sensitive. Lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang berada pada ketiga kategori tersebut, dengan kisaran rata-rata zona hambat antibiotik 9,33-22,33 mm (Lampiran 1).

Tabel 4.3. Rata-Rata Diameter zona hambat pada Uji Sensitivitas Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang Terhadap Beberapa Jenis Antibiotik (mm)

Isolat	Jenis Antibiotik					
	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

Keterangan: 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=intermediet, S=sensitif/rentan

Seluruh isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang resisten terhadap antibiotik Oxytetracycline dan Nalidix Acid, sedangkan terhadap antibiotik Norfloxacin, Chloramphenicol dan Gentamycin tergolong intermediet sampai sensitive. Resistensi

terhadap antibiotik bakteri asam laktat tergantung pada jenis dan sumber isolat tersebut (Salminen *et al.*, 1998). Resistensi dari isolat bakteri probiotik sangat membantu dalam aplikasi bersamaan dengan antibiotik di lingkungan budidaya, bakteri tersebut akan bertahan lama dalam saluran pencernaan ikan dan tidak terpengaruh oleh terapi dengan antibiotik. Oleh karena itu, resistivitas isolat tersebut bisa menjadi keuntungan. Walaupun demikian, ditemukan juga beberapa isolat bakteri asam laktat dari usus ikan yang sensitiv terhadap beberapa jenis antibiotik (Hanol *et al.*, 2020). Ikan repang yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ikan liar yang peluang terpapar dengan bahan kimia atau antibiotik rendah sehingga wajar jika ditemukan isolat dari ususnya yang sensitive terhadap antibiotik, hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Agustina *et al.* (2018), pada ikan kelabau.

D. Toleransi isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap beberapa media

Isolat bakteri asam laktat diuji kemampuannya dalam mentolerasi beberapa media tanam dan menunjukkan kemampuan toleransi yang berbeda (Tabel 4.4 dan 4.5). Nilai densitas optikal atau kekeruhan menunjukkan tingkat pertumbuhan bakteri asam laktat dalam media kaldu (MRSB). Semakin besar nilai OD maka semakin tinggi pertumbuhan atau toleransinya terhadap perlakuan tersebut, begitu pula sebaliknya semakin kecil nilai OD maka toleransi bakteri asam laktat terhadap media semakin rendah.

Tabel 4.4. Rata-Rata Nilai Densitas Optikal (OD) Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang pada Media dengan Kadar Ph dan Garam Empedu Berbeda

Isolat	pH			Garam Empedu		
	pH 2	pH 4	pH 8	1%	2%	3%
R1	0,08	0,76	0,93	0,82	0,92	0,93
R2	0,12	0,37	1,01	0,80	0,87	0,90
R3	0,11	0,28	0,96	0,78	0,89	0,93
R4	0,11	0,18	0,93	0,82	0,91	0,93
R5	0,09	0,20	0,90	0,71	0,73	0,82

Tabel 4.5. Rata-Rata Nilai Densitas Optik (OD) Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang pada Media dengan Suhu dan Kadar Garam Berbeda

Isolat	Suhu			Kadar garam		
	15 °C	25 °C	45 °C	3%	5%	7%
R1	0,04	1,58	0,82	1,41	1,38	0,90
R2	0,07	0,70	0,48	0,66	0,49	0,09
R3	0,06	1,58	0,95	1,47	1,37	0,52
R4	0,03	1,45	0,96	1,32	1,23	0,32
R5	0,07	1,60	1,05	1,48	1,34	0,53

Pada tabel 4.4 dapat dilihat bahwa lima isolat bakteri asam laktat yang berasal dari usus ikan repang masih bisa hidup pada media dengan pH asam-basa (pH 2-8). Toleransi terhadap pH ini semakin meningkat sejalan dengan naiknya kadar pH. Hal ini terkait dengan kemampuan bakteri asam laktat untuk hidup dan berkembang di dalam saluran pencernaan ikan pada aplikasi probiotik mengingat kondisi asam di lambung ikan. Kriteria penting untuk seleksi bakteri asam laktat sebagai probiotik adalah viabilitas yang potensial pada pH rendah (Kim and Austin 2007). Sejalan dengan penelitian ini, Vijayaram *et al.* (2016) menemukan bahwa isolat bakteri dari beberapa jenis ikan air tawar mampu hidup pada pH 2-4,5 selama 24 jam inkubasi. Berbeda dengan yang dilaporkan Allameh *et al.* (2012), isolat bakteri asam laktat dari usus ikan gabus tidak bisa hidup pada pH 2 tetapi pada pH 3-8 dengan lama inkubasi selama 2 jam. Hal ini juga dilaporkan oleh Jahangiri *et al.* (2018), inkubasi selama 2 jam tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri asam laktat pada pH 2.5.

Toleransi isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang juga ditunjukkan terhadap kadar garam empedu 1-3 %. Hasil ini sejalan dengan yang ditemukan oleh Prachom *et al.* (2020) yang menguji isolat bakteri asam laktat pada empedu segar, mulai konsentrasi 0-10%, bakteri masih tumbuh dengan baik sampai kadar 8% lalu menurun pada kadar 10%. Beberapa studi melaporkan bahwa probiotik harus mampu bertahan atau resisten terhadap bahan-bahan yang menghambat pertumbuhannya di dalam saluran pencernaan, seperti garam empedu (Allameh *et al.*, 2012; Prabhurajeshwar and Chandrakanth, 2017).

Isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari usus ikan repang mampu hidup pada kisaran suhu 15-45 °C, walaupun mengalami penurunan di suhu 45 °C. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Risna *et al.* (2020) yang menemukan bahwa isolat bakteri asam laktat dari usus bebek mampu hidup pada suhu 15-45 °C dan optimum pada suhu 37 °C. Hal ini diduga bahwa bakteri asam laktat merupakan golongan bakteri mesophilic. Walaupun demikian memang ada beberapa spesies dari bakteri ini yang mampu tumbuh pada suhu 45°C (Mulaw *et al.*, 2019).

Toleransi lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap kadar garam (NaCl) ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan yang meningkat dari kadar NaCl 3-7%. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan Patel *et al.* (2020), bahwa isolat bakteri asam laktat (*Lactococcus garviae*) mampu hidup pada kisaran kadar garam 3-7%, hanya saja mengalami penurunan pada kadar garam 7%. NaCl merupakan satu substansi yang mampu menghambat pertumbuhan beberapa jenis bakteri, pada penelitian ini isolat bakteri asam laktat masih sanggup hidup pada kadar garam 7% menjadi indikasi bahwa bakteri ini ideal sebagai kandidat probiotik.

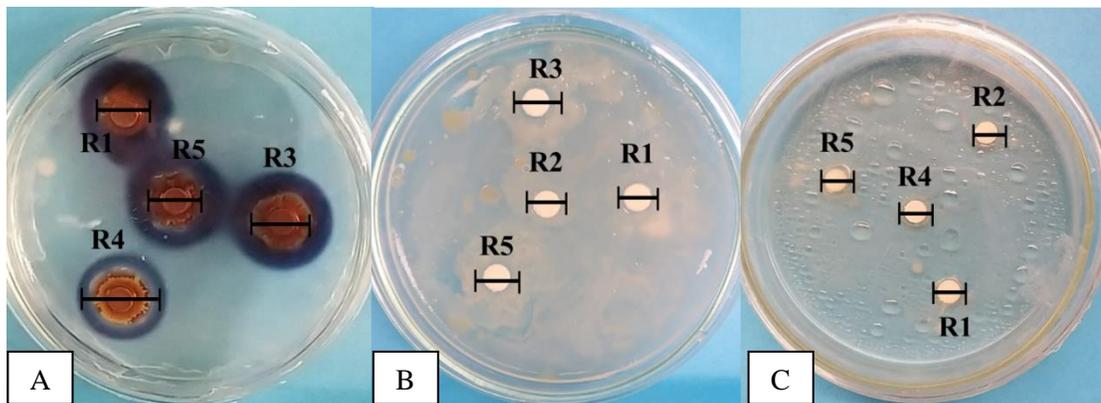
E. Aktivitas Enzimatis Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang

Uji aktivitas enzimatis lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dilakukan meliputi aktivitas amilolitik, proteolitik dan lipolitik. Data yang diperoleh menunjukkan bahwa kelima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang menunjukkan kemampuan dalam melisis karbohidrat (media dengan penambahan amilum), protein (media dengan penambahan susu skim) serta lipid (media dengan penambahan minyak zaitun). Pada Tabel 4.6 terlihat bahwa ukuran zona bening untuk aktivitas amilolitik berkisar antara 1,22-1,62, aktivitas proteolitik berkisar antara 1,26-1,49 dan aktivitas lipolitik berkisar antara 1,19-1,26. Aktivitas enzimatis penting ketahui dalam penapisan probiotik sebagai gambaran kemampuan mikroba dalam meningkatkan pencernaan nutrisi inang.

Tabel 4.6. Rata-Rata Indeks Hidrolisis Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Rebang

Isolat	Indeks Hidrolisis		
	Amilolitik	Proteolitik	Lipolitik
R1	1,22	1,26	1,19
R2	1,32	1,42	1,24
R3	1,48	1,49	1,32
R4	1,62	1,41	1,27
R5	1,42	1,44	1,26

Adanya zona bening pada uji amilolitik, proteolitik dan lipolitik menunjukkan bahwa isolat bakteri asam laktat dari usus ikan rebang mampu melisis atau mendegradasi karbohidrat dari tepung, protein dari susu skim dan lemak dari minyak zaitun. Keberadaan enzim ekstraseluler seperti amylase, protease dan lipase merupakan kriteria yang harus dimiliki oleh probiotik untuk meningkatkan pencernaan makanan. Enzim yang diproduksi oleh probiotik berperan penting dalam degradasi beragam bahan makanan yang sulit untuk dicerna oleh ikan.



Gambar 4.4. Zona bening yang dihasilkan pada uji aktivitas enzimatis bakteri asam laktat dari usus ikan rebang: (A) Amylolitik, (B) Proteolitik, (C) Lipolitik

Menurut Balcazar *et al* (2006), kemampuan probiotik dalam memproduksi enzim ekstraseluler berpengaruh dalam meningkatkan pencernaan dari inang. Isolat bakteri asam laktat dari usus ikan rebang memiliki indeks hidrolisis amilolitik dan proteolitik dibanding lipolitik, hal ini dikaitkan dengan kecenderungan makan ikan

rebang di alam sebagai ikan omnivore yang mengkonsumsi beragam jenis makanan seperti tumbuhan dan zoobenthos sebagai makanan utama, dan makanan pelengkapanya berupa serangga, sedangkan makanan tambahan berupa plankton dan cacing (Kaban *et al.*, 2016). Saluran pencernaan ikan megandung populasi mikroba dari lingkungan akuatik, yaitu air dan makanan (Ganguly and Prasad, 2012). Indeks hidrolisis amilolitik dan proteolitik bakteri asam laktat dari usus ikan rebang pada penelitian ini lebih tinggi dibanding pada penelitian Mulyasari *et al.* (2016) yang menguji aktivitas enzimatis bakteri dari usus ikan gurami.

F. Identifikasi Biomolekuler Isolat Bakteri dari Usus Ikan Rebang

Isolat bakteri asam laktat dari usus ikan kelabau yang menunjukkan aktivitas antibakterial terbaik terhadap bakteri patogen *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp. dan *E. ictaluri* serta memenuhi kriteria lain sebagai kandidat probiotik pada uji secara *in vitro* yaitu Isolat R2, R3 dan R5. Berdasarkan hasil uji biomolekular diidentifikasi sebagai berikut: R2 sebagai *Enterococcus faecalis* MZ540312, R3 sebagai *Lactiplantibacillus plantarum* MZ540311 dan R5 sebagai *Lactococcus lactis* MZ540313 (Tabel 4.7 dan Tabel 4.8).

Tabel 4.7. Hasil Identifikasi Molekuler Tiga Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Rebang

No	Kode sampel	Nama hasil blast	Accession number	Panjang sekuen (Bp)	Ident (%)	Query Cover (%)
1.	R2	<i>Enterococcus faecalis</i>	MZ540312	1439	99.93	100
2.	R3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MZ540311	1479	95.53	99
3.	R5	<i>Lactococcus lactis</i>	MZ540313	1422	99.76	100

Tabel 4.8. Fasta Sekuens DNA Bakteri Usus Ikan Repang

No.	Kode Sampel	Basa Nitrogen Hasil Sekuens
1.	R2	ACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGC ACT CAATTGGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG GGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGG TGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGT GAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGT GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACG ATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA ATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCG TGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGA GAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTA TCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCG TAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTTCATTGGAACTGGGAGACT TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTG AAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCG CTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGG AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AAC GATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTG CAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCCG AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC GGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCT TACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCT TTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGT CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGC GCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTA GCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC GTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC TACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCAT GCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGC AACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT CAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC GCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTG AGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGT
2.	R3	TATACATGCAAGTCGAACGACTCTGGTATGTGATTGGTGC TTGTCGATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTG AGTAACACGTGGGAAACCTGCCATAAGCGGGGGATAACAC CTGGCAAACAGATGCTAATACCGCATAACA ACTTGGTACCG CATGGTCCGAGCTTCAAACATGGCTTCTGCTATCACTTTTGG ATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTC

No.	Kode Sampel	Basa Nitrogen Hasil Sekuens
3.	R5	<p> ACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCCG CCACATTGGGACTGACACACGGCCAACTCCTACGGGAGG CAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGG AGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAATGGTTTCGGCTCGTAAAA CTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAG GTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG ATTTATTGGGCGTAAATCAAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCT GATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAGATGCATCGGAA ACTGAGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCAT GTGTATCGGTGAGATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGT GGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCCTGAGAGC TCGAAAAGTATGTGGTAGCCCAACAGGATTTAGATACCCCTG GTAGTCCATACCGTAAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGG GTCTCCGCCCTTTCAGTGCTGGCAGCTAACGCATTAAGCATT CCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGA ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGGAGGCATGTGGTTT AATTTGAAGCTACGGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATAC TATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGG ATACAGGTGGTGCATGGTTGTTGTCAGCTTGTGTTGTGAGAT GTTGGGTTAAGTTCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTATCAGT TGCCAGCATTAAAGTTGGGCCCTTCTGGTGAAGTACGCGGTGA CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCCTCAAGCC CCTTATGACCTGGGGTACACACGTGCTACCAAGGATGGTACC ACGAGGTGGGAACCTCGCGAGAGTAAGCTAATTTTTTAAAGC CATTTTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTTGCCTACATGAA GTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA ATACGTTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATG AGGAGTTTGTAACTACCCAGAAGTTCGGTGGCGTAACTGTG TAGGAACCCAGCCTTGCCTTAAGGTT </p> <p> TACATGCAAGTTGAGCGCTGAAAGTTGGTACTTGTACCGACT GGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAATCTGC CTTTGAGCGGGGGACAACATTTGGAAACGAATGCTAATACC GCATAAAAACCTTTAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAGATGCA ATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTT GGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGAC CTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG GACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG TTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGT GAGAGTGGAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCCAGAAA GGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG GTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC </p>

No.	Kode Sampel	Basa Nitrogen Hasil Sekuens
		AGGTGGTTTATTAAGTCTGGTGTAAGGCAGTGGCTCAACC ATTGTATGCATTGGAACTGGTAGACTTGAGTGCAGGAGAG GAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT ATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTA ACTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT AGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGA TGTAGGGAGCTATAAGTTCTCTGTATCGCAGCTAACGCAATA AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCA AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG TTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACA TACTCGTGCTATTCCCTAGAGATAGGAAGTTCCTTCGGGACAC GGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTT AGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAACGAGACTGCCGGT GATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTA CAACGAGTCGCGAGACAGTGATGTTTAGCTAATCTCTTAAAA CCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGA AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTG AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAG GGAGTTGGGAGTACCCGAAGTAGGTGCCTAACCGCAAGGAG GGCGCTTCCTAA

Enterococcus faecalis merupakan spesies dari genus *Enterococcus* merupakan bakteri asam laktat yang ditemukan sebagai bakteri indigenous atau autochthonous pada saluran pencernaan ikan dengan kelimpahan yang rendah pada usus bagian belakang ikan rainbow trout (Lyons *et al.*, 2017). Shahid *et al.* (2017) juga melaporkan bahwa *E. faecalis* juga berhasil diisolasi pada saluran pencernaan ikan mrigal (*Cirrhinus mrigala*). Bakteri *E. faecalis* juga telah menunjukkan potensi sebagai probiotik pada ikan Javanese carp (*Puntius gonionotus*) dengan meningkatnya pertumbuhan, parameter hematologi serta histomorfologi ususnya (Allameh *et al.*, 2016) dan dari usus udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) juga berpotensi sebagai probiotik (Mohamad *et al.*, 2020).

Lactiplantibacillus plantarum (sebelumnya dikenal sebagai *Lactobacillus plantarum*) beradaptasi di dalam usus ikan diantaranya air tawar Mediterranean Trout (*Salmo macrostigma*) dan ditemukan pula di lingkungan perairan, menunjukkan

aktivitas enzim sebagaimana pada bakteri asam laktat lain dalam mendegradasi karbohidrat, protein dan lipid (Iorizzo *et al.*, 2021). Garcia-Gonzalez *et al.* (2021) melaporkan bahwa *L. plantarum* yang diisolasi dari makanan yang difermentasi bisa menjadi probiotik ketika diformulasikan dalam makanan dengan ditunjukkannya adaptasi yang baik dalam usus, kemampuan melekat di dalam saluran pencernaan dan berpotensi memengaruhi kesehatan inang seperti sifat antimikrobial, antigenotoksik, anti inflamasi dan imunomodulasi pada kajian *in vitro* dan *in vivo*.

Lactococcus lactis termasuk dalam genus *Lactococcus* sebagai bakteri asam laktat merupakan bakteri indigenus yang banyak ditemukan di usus ikan, seperti di usus grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) pada penelitian Dong *et al.* (2017). Alonso *et al.* (2018) juga menemukan strain spesies *Lactococcus lactis* dari usus beberapa ikan air laut yang menunjukkan kemampuan antibakterial terhadap patogen, toleran terhadap kadar garam dan berpotensi sebagai probiotik. Kemampuan antibakterial pada *L.lactis* (subsp.*lactis*) diduga disebabkan adanya bakteriosin, kelas Lantibiotics yang menghasilkan biosin jenis Nisin, lactocin, dan mersaciadin (Parada *et al.*, 2007). *L.lactis* juga ditemukan mampu mendukung pertumbuhan, parameter imunitas dan ketahanan penyakit pada ikan sebelah (Nguyen *et al.* 2017).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ‘Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (*P. waandersi*) sebagai Probiotik pada Ikan’ maka dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Ada lima isolat bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi dari usus ikan repang (*P. waandersi*) yaitu R1, R2, R3, R4 dan R5. Identifikasi secara biokimia menunjukkan bahwa isolat R1 dan R2 sebagai *Enterococcus*, R3 sebagai *Lactobacillus*, R4 dan R5 sebagai *Lactococcus*.
2. Kelima isolat bakteri asam laktat menunjukkan aktivitas antibakterial terhadap bakteri patogen *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp. dan *E. ictaluri* dalam kategori kuat. Isolat R2, R3 dan R5 menunjukkan aktivitas antibakterial terbaik, sensitivitas terhadap beberapa antibiotik termasuk kategori resisten.
3. Kelima isolat bakteri asam laktat menunjukkan toleransi terhadap pH media, garam empedu, suhu dan kadar garam.
4. Kelima isolat bakteri asam laktat menunjukkan aktivitas enzimatis amilolitik, dan proteolitik yang lebih tinggi dibanding lipolitik.
5. Tiga isolat yang menunjukkan aktivitas antibakterial terbaik diidentifikasi secara biomolekuler yaitu R2 sebagai *Enterococcus faecalis* MZ540312, R3 sebagai *Lactiplantibacillus plantarum* MZ540311 dan R5 sebagai *Lactococcus lactis* MZ540313, ketiga bakteri tersebut memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai probiotik pada ikan.

B. Saran

Beberapa hal yang menjadi saran dari hasil penelitian ‘Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (*P. waandersi*) sebagai Probiotik pada Ikan’:

1. Uji secara *in vivo* perlu dilakukan sebagai langkah selanjutnya untuk mengembangkan ketiga bakteri asam laktat dari usus ikan repang sebagai probiotik pada ikan.
2. Pengembangan probiotik di masa yang akan datang tidak hanya berfokus pada peningkatan ketahanan terhadap penyakit tapi juga terkait dengan performa pertumbuhan ikan.
3. Perlu dilakukan edukasi bagi masyarakat terutama di daerah yang berbatasan langsung dengan Sungai Mahakam maupun danau-danau yang ada di sekitarnya bahwa ikan lokal memiliki potensi yang besar sehingga layak untuk dibudidayakan.

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. Pathogenicity 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. *AACL Bioflux* 11 (6): 1859-1868.
- Agustina, S.B. Prayitno, A. Sabdono and G. Saptiani. 2019. Pathogenicity Assay of Probiotic-Potential Bacteria from The Kelabau Fish (*Osteochilus melanopleurus*). *AACL Bioflux* 6(5): 1994-2003.
- 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.
- Allameh, S. K., F. M. Yusoff, E. Ringø, H. M. Daud, C. R. Saad, and A. Ideris. 2016. Effects of dietary mono- and multiprobiotic strains on growth performance, gut bacteria and body composition of Javanese carp (*Puntius gonionotus*, Bleeker 1850). *Aquacult. Nutr.* 22: 367-73.
- Allameh, S.K., H. Daud, F. M. Yusoff, C. R. Saad and A. Ideris. 2012. Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*) *African Journal of Biotechnology* 11(16): 3810-3816.
- Alonso, S., M.C. Castrol, M. Berdascol, I.G. de la Banda X. Moreno-Ventas and, and A.H. de Rojas. Isolation and Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture. 2019. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 11(2): 569-579.

- 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.
- Balcázar J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuola, D. Cunningham, D. Vendrell, and J. L. Múzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114(3-4):173-186.
- Balcazar, J.L., V. Vendrell, I. de Blas and I. Ruiz-Zarzuola. 2008. Characterization of Probiotic Properties of Lactid Acid Bacteria Isolated from Intestinal Microbiota Fish Characterization of Probiotic Properties of Lactid Acid Bacteria Isolated from Intestinal Microbiota Fish. *Aquaculture* 278: 188-191.
- 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.
- Dong, B., Y. Yi, L. Liang, and Q. Shi. 2017. High throughput identification of antimicrobial peptides from fish gastrointestinal microbiota. *Toxins* 9:266.
- 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.
- Ganguly, S., and A.Prasad. 2012. Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22(1):11-16.

- Garcia-Gonzalez, N., N. Battista, R. Prete, and A. Corsetti. 2021. Health-Promoting Role of *Lactiplantibacillus plantarum* Isolated from Fermented Foods. *Microorganisms*, 9: 349.
- 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. 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.
- Hasan, K.N. and G. Banerjee. 2020. Recent studies on probiotic as beneficial mediator in aquaculture: a review. *The Journal of Basic and Applied Zoology* 8: 53.
- Hawke, J.P., A.C. McWhorter, A.G. Steigerwait, and D.J. Brenner. 1981. *Edwardsiella ictaluri*, the causative agent of enteric septicemia 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.
- 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.
- 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.
- Ibrahim, 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.
- Iorizzo, M., G. Albanese, B. Testa, M. Ianiro, F. Letizia, M. Succi, P. Tremonte, M. D'Andrea, N. Iaffaldano, and R. Coppola, R. 2021. Presence of Lactic Acid Bacteria in the Intestinal Tract of the Mediterranean Trout (*Salmo macrostigma*) in Its Natural Environment. *Life* 11: 667.
- Irwansyah, T. S. Raza'i, dan R.Wulandari. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Saluran Pencernaan Ikan Bawal Bintang (*Trachinotus blochii*). *Intek Akuakultur*. Volume 2. Nomor 2. Tahun 2018. E-ISSN 2579-6291. Hal 25-32.
- Iwashita, M.K.P., I.B. Nakandakare, J.S. Terhune and T, Wood. 2015. Dietary Supplementation with *Bacillus Subtilis*, *Saccharomyces*, and *Aspergillus Oryzae*, Enhance Immunity and Disease Resistance Against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus inae* Infection in Juvenile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 43: 60-66.
- Jahangiri, L., M. Sudagar1, O. Ashayerizadeh, H. Kolangi1, and A. Tabarraei. 2018. Isolation of Probiotic Bacteria from Guppy *Poeciliareticulata* (Cyprinodontiformes:Poeciliidae). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 18: 809-815.
- 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.
- Kaktcham, P.M., J-B. Temgoua, F. N. Zambou, G. Diaz-Ruiz, C. Wachter and M. L. Pérez-Chabela. 2017. Quantitative analyses of the bacterial microbiota of rearing environment, tilapia and common carp cultured in earthen ponds and inhibitory activity of its lactic acid bacteria on fish spoilage and pathogenic bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 33:32.
- 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.

- Kim, D.H. and B. Austin. 2008. Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Lett. Appl. Microbiol.* 47(3): 141-147.
- 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.
- 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.
- 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 allochthonous gut microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) determined using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Aquaculture Research*, 39: 635-646.
- Lyons, P. P., J. F. Turnbull, K. A. Dawson, and M. Crumlish. 2017. Exploring the microbial diversity of the distal lumen and mucosa of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) using next generation sequencing (NGS). *Aquacult Res.* 48: 77-91.
- 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.
- Merrifield, D. and E. Ringo. 2014. *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotic and Prebiotic*. Wiley-Blackwell. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, UK. 465 p.

- Mohamad, N., H. Manan, M. Sallehuddin, N. Musa, M. Ikhwanuddin. 2020. Screening of Lactic Acid Bacteria isolated from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) as potential probiotics. *Aquaculture Reports* 18: 100523.
- 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.
- Mulaw G., TS. Tessema, D. Muleta, and A. Tesfaye. 2019. In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented Ethiopian food products. *Intl J Microbiol* DOI: 10.1155/2019/7179514.
- 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.
- Mulyasari, Widanarni, M. A. Suprayudi, M. Zairin Jr., M. T. D. Sunarno. 2016. Screening of probiotics from the digestive tract of gouramy (*Osphronemus goramy*) and their potency to enhance the growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *AAAL Bioflux* 9(5): 1121-1132.
- Nayak, S.K. 2010. Probiotics and Immunity: A Fish Perspective. Review. *Fish & Shellfish immunology* 29: 2-14.
- 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.
- Nguyen, T. L., C-I. Park, and D-H. Kim. 2017. Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. *Aquaculture* 471: 113-120.
- 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> [11-08-2006].
- Parada, J. L., C. R. Caron, A. B. P. Medeiros, and C. R. Soccol. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Braz. Arch Biol. Technol.* 50: 521-542.

- 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-Zarzuela. 2011. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Diseases* 34: 499-507.
- Plump, J.A. and L.A. Hanson. 2011. *Health Maintenance & Principal Microbial Diseases of Cultured Fish*. Third Edition. Wiley-Blackwell. Blackwell Publishing Ltd. Iowa, USA. 492 p.
- Prabhurajeshwar, C., and R. K. Chandrakanth. 2017. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An *in vitro* validation for the production of inhibitory substances. *Biomedical Journal* 40:270-283.
- Prachom, N., K. Rumjuankiat, A. Sanguankiat, S. Boonyoung and K. Pilasombut. 2020. *In vitro* screening of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from intestinal contents and gills of Nile tilapia. *International Journal of Agricultural Technology* 16(4):937-948.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Salminen, S., A. Von Wright, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W. M. de Vos, R. Fonden, M. Saxelin, K. Collins, G. Mogensen, S. E. Birkeland, and T. Mattila-Sandholm. 1998. Demonstration of safety of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 44: 93-106.
- Shahid, M., B. Hussain, D. Riaz, M. Khurshid, M. Ismail, and M. Tariq. 2017. Identification and partial characterization of potential probiotic lactic acid bacteria in freshwater *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala*. *Aquacult. Res.* 48, 1688–1698.
- 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.
- Suciati1, P., W. Tjahjaningsih, E.D. Masithah dan H. Pramono. 2016. Aktivitas Enzimatis Isolat Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Kepiting Bakau (*Scylla* spp.) Sebagai Kandidat Probiotik. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan* (ISSN: 2085-5842) 8(2): 94-108.
- Sunitha, K. and P.V. Krishna. 2016. Efficacy of Probiotics in Water Quality and Bacterial Biochemical Characterization of Fish Ponds. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 5(9): 30-37.
- Svetlitshnyl, V., F. Rainey, and J. Wiegel. 1996. *Thermosyntropha Lipolytica* Grn. Nov., sp. Nov., a Lipolytic, Anaerobic, Alkalitolerant, Thermophilic Bacterium Utilizing Short and Long Chain Fatty Acidin Syntrophic Coculture with a Methanogenic Archaeum. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 1131-1137.

- 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.
- Verma, G. and A. Gupta. 2015. Probiotic Application in Aquaculture: Improving Nutrition and Health. J. Anim. Feed Sci. Tech. 3: 53-64.
- Vijayaram, S., S. Kannan and S. Muthukumar. 2016. Isolation and characterization of probiotic bacteria isolated from diverse fish fauna of the trodden Vaigai river at Theni district. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research ISSN: 0975-7384, 8(7):883-889.
- Waltman, W.D., E.B. Shotts, and T.C. Hsu. 1986. Biochemical characteristics of *Edwardsiella ictaluri*. Applied and Environmental Microbiology 51(1), 101-104.
- Wulandari, R., A Rantetondok, dan A. Anshary. 2015, Isolasi bakteri asam laktat dari usus ikan lele untuk pengendalian bakteri *Streptococcus* pada ikan nila, Jurnal Ilmu Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, UNHAS.
- 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.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Rata-rata diameter zona hambat pada uji sensitivitas bakteri asam laktat dari usus ikan rebang terhadap beberapa jenis antibiotik (mm)

Isolat	Kontrol	Jenis Antibiotik
--------	---------	------------------

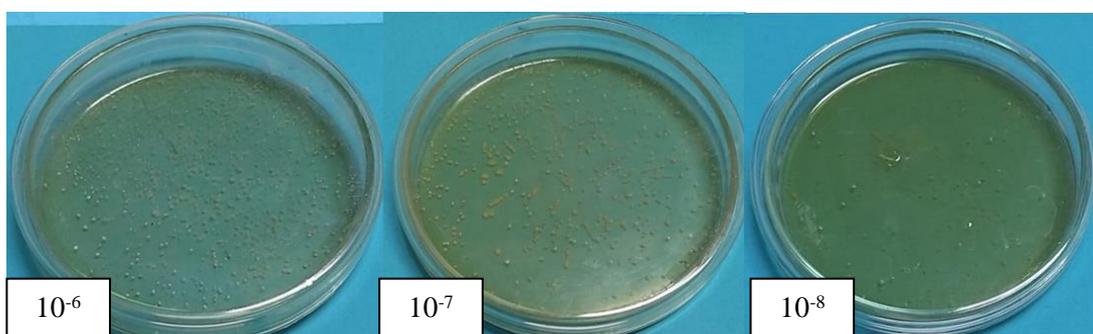
	(-)	CIP	NOR	C	CN	NA	OT
R1	7,33	19,33	16,33	15,00	15,67	9,33	9,67
R2	8,33	11,00	10,67	9,67	14,33	12,33	9,67
R3	8,33	20,00	17,33	14,00	21,67	9,67	9,67
R4	8,67	18,00	17,33	13,33	15,33	12,67	12,33
R5	8,67	22,33	16,67	13,33	17,67	10,33	10,67

Keterangan: 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)

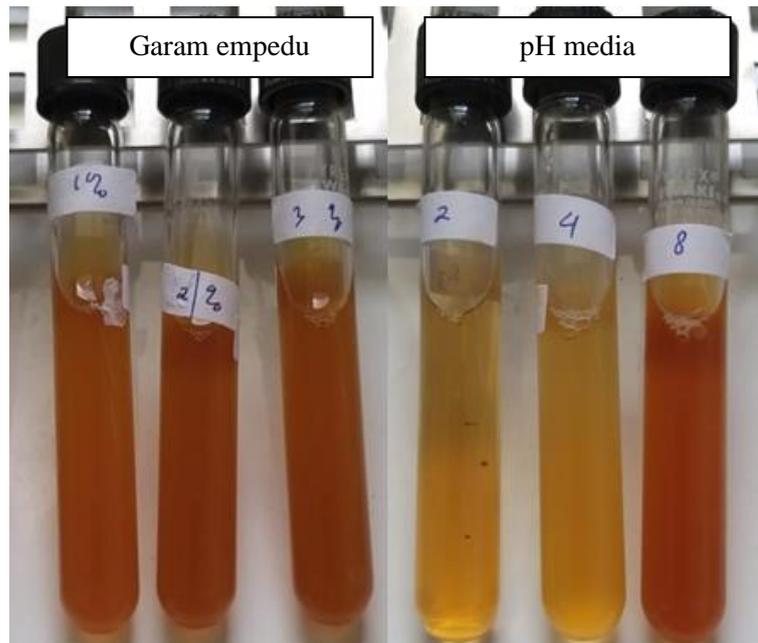
Lampiran 2. Dokumentasi penelitian



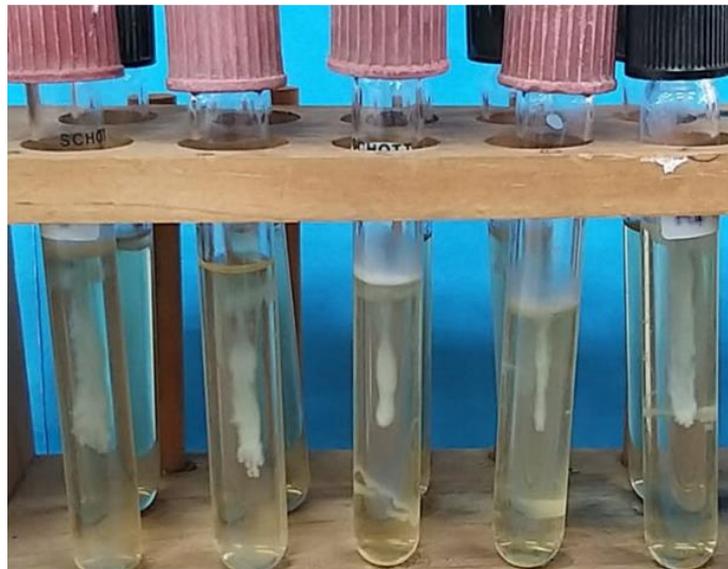
Gambar 1. Sampel ikan repang dari Sungai Mahakam



Gambar 1. Kepadatan bakteri asam laktat dari usus ikan repang pada uji TPC (10^{-6} , 10^{-7} dan 10^{-8})



Gambar 3. Pertumbuhan bakteri asam laktat pada kadar garam empedu (1%, 2% dan 3%) dan pH (2, 4, 8)



Gambar 4. Uji motilitas bakteri sam laktat dari usus ikan repang



Gambar 5. Uji pemanfaatan karbohidrat bakteri asam laktat dari usus ikan repang



Gambar 5. Uji pembentukan gas bakteri asam laktat dari usus ikan repang



Gambar 6. Uji Methyl Red (MR) bakteri asam laktat dari usus ikan re pang



Gambar 7. Uji Voges-Proskauer bakteri asam laktat dari usus ikan re pang

Lampiran 3. Rincian Anggaran Belanja Penelitian ‘Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (*P. waandersi*) sebagai Probiotik pada Ikan’

No.	Uraian	Jumlah	Harga satuan	Total
A	Pengambilan sampel ke Kota Bangun			
1	Biaya sewa mobil (PP)	2	Rp 500.000,00	Rp 1.000.000,00
2	Biaya Lumpsum	3	Rp 400.000,00	Rp 1.200.000,00
B	Bahan habis pakai			
2	Media MRSA 500 g	1	Rp 1.780.000,00	Rp 1.780.000,00
3	Media MRSB 500 g	1	Rp 1.830.000,00	Rp 1.830.000,00
4	Akuades 5 liter	5	Rp 20.000,00	Rp 100.000,00
5	Media TSA 500 g	1	Rp 1.065.000,00	Rp 1.065.000,00
6	Media TSB 500 g	1	Rp 1.075.000,00	Rp 1.075.000,00
7	Antibiotic paper disc blank oxoid	1	Rp 720.000,00	Rp 720.000,00
8	Antibiotic paper disc oxoid (6 jenis antibiotik)	6	Rp 695.000,00	Rp 4.170.000,00
10	Amilum Merck 50 g	1	Rp 515.000,00	Rp 515.000,00
11	Susu skim 1 Kg	1	Rp 125.000,00	Rp 125.000,00
12	HCl merck 100 mL	1	Rp 270.000,00	Rp 270.000,00
13	NaOH Merck 30 g	1	Rp 245.000,00	Rp 245.000,00
14	NaCl merck 100 g	1	Rp 125.000,00	Rp 125.000,00
15	Fresh bile salt 100 mL	1	Rp 100.000,00	Rp 100.000,00
16	Alkohol 70% 2 L	2	Rp 40.000,00	Rp 80.000,00
18	Styrofoam	1	Rp 150.000,00	Rp 150.000,00
C	Biaya pengujian			
21	Identifikasi molekuler 3 isolat bakteri	3	Rp 1.500.000,00	Rp 4.500.000,00
22	Identifikasi biokimia 5 isolat bakteri	5	Rp 150.000,00	Rp 750.000,00
D	Penyusunan laporan			
23	Biaya cetak dan jilid laporan	1	Rp 200.000,00	Rp 200.000,00
				Rp 20.000.000,00

Terbilang: **Dua puluh juta rupiah**