



POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI USUS IKAN REPANG

(Puntioplites waandersi)

SEBAGAI PROBIOTIK PADA IKAN

Agustina



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

UU No 28 tahun 2014 tentang Hak Cipta

Fungsi dan sifat hak cipta Pasal 4

Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 huruf a merupakan hak eksklusif yang terdiri atas hak moral dan hak ekonomi.

Pembatasan Pelindungan Pasal 26

Ketentuan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 23, Pasal 24, dan Pasal 25 tidak berlaku terhadap:

- i. Penggunaan kutipan singkat Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait untuk pelaporan peristiwa aktual yang ditujukan hanya untuk keperluan penyediaan informasi aktual;
- ii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk kepentingan penelitian ilmu pengetahuan;
- iii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk keperluan pengajaran, kecuali pertunjukan dan Fonogram yang telah dilakukan Pengumuman sebagai bahan ajar; dan
- iv. Penggunaan untuk kepentingan pendidikan dan pengembangan ilmu pengetahuan yang memungkinkan suatu Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait dapat digunakan tanpa izin Pelaku Pertunjukan, Produser Fonogram, atau Lembaga Penyiaran.

Sanksi Pelanggaran Pasal 113

1. Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

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

Agustina

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

Agustina

Desain Cover :
Rulie Gunadi

Sumber :
www.shutterstock.com

Tata Letak :
T. Yuliyanti

Proofreader :
Tiara Nabilah Azalia

Ukuran :
x, 64 hlm, Uk: 15.5x23 cm

ISBN :
978-623-02-6714-7

Cetakan Pertama :
Juni 2023

Hak Cipta 2023, Pada Penulis

Isi diluar tanggung jawab percetakan

Copyright © 2023 by Deepublish Publisher
All Right Reserved

Hak cipta dilindungi undang-undang
Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau
memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini
tanpa izin tertulis dari Penerbit.

PENERBIT DEEPUBLISH
(Grup Penerbitan CV BUDI UTAMA)

Anggota IKAPI (076/DIY/2012)

Jl.Rajawali, G. Elang 6, No 3, Drono, Sardonoharjo, Ngaglik, Sleman
Jl.Kaliurang Km.9,3 – Yogyakarta 55581

Telp/Faks: (0274) 4533427

Website: www.deepublish.co.id

www.penerbitdeepublish.com

E-mail: cs@deepublish.co.id

KATA PENGANTAR PENERBIT

Segala puji kami haturkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, atas limpahan segala anugerah dan karunia-Nya. Dalam rangka mencerdaskan dan memuliakan umat manusia dengan penyediaan serta pemanfaatan ilmu pengetahuan dan teknologi untuk menciptakan industri *processing* berbasis sumber daya alam (SDA) Indonesia, Penerbit Deepublish dengan bangga menerbitkan buku dengan judul ***POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI USUS IKAN REPANG (*Puntiplites waandersi*) SEBAGAI PROBIOTIK PADA IKAN.***

Terima kasih dan penghargaan terbesar kami sampaikan kepada penulis, Dr. Agustina, S.Pi., M.Si., yang telah memberikan kepercayaan, perhatian, dan kontribusi penuh demi kesempurnaan buku ini. Semoga buku ini bermanfaat bagi semua pembaca, mampu berkontribusi dalam mencerdaskan dan memuliakan umat manusia, serta mengoptimalkan pemanfaatan ilmu pengetahuan dan teknologi di tanah air.

Hormat Kami,

Penerbit Deepublish

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah *robbal 'aalamin*, puji syukur penulis panjatkan kepada Allah *Subhanahu Wa Ta'ala* atas segala rahmat, taufik, nikmat serta hidayah-Nya, sehingga buku ini dapat terselesaikan dengan baik oleh penulis. Selawat dan salam kepada junjungan Nabi Besar Muhammad *shallallahu alaihi wasallam* sebaik-baiknya teladan juga beserta keluarga, sahabat, dan pengikut beliau hingga akhir zaman.

Penulis berharap buku ini dapat bermanfaat dan memberikan wawasan bagi pihak-pihak yang berkepentingan dengan bidang ini, serta menjadi referensi baru dalam pengelolaan kesehatan akuakultur di masa depan.

Samarinda, Maret 2023

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|--|-----------|
| KATA PENGANTAR PENERBIT | v |
| KATA PENGANTAR..... | vi |
| DAFTAR ISI | vii |
| DAFTAR TABEL | ix |
| DAFTAR GAMBAR..... | x |
| I PROLOG | 1 |
| II DISKUSI WACANA | 3 |
| 2.1. Biologi dan Sistematika Ikan Repang (<i>Puntioplites waandersi</i>) | 3 |
| 2.2. Bakteri Patogen pada Ikan Air Tawar | 5 |
| 2.2.1. Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> | 5 |
| 2.2.2. Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. | 7 |
| 2.2.3. Bakteri <i>Edwardsiella ictaluri</i> | 8 |
| 2.3. Bakteri Asam Laktat sebagai Probiotik dalam Akuakultur | 9 |
| 2.3.1. Bakteri Asam Laktat dan Manfaatnya Bagi Organisme Akuatik..... | 9 |
| 2.3.2. Penapisan Bakteri Asam Laktat sebagai Kandidat Probiotik..... | 13 |
| III POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI USUS IKAN REPANG SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK SECARA <i>IN VITRO</i> | 15 |
| 3.1. Isolasi dan Karakterisasi Biokimia Bakteri Asam Laktat..... | 15 |
| 3.3.1. Tahap Persiapan..... | 15 |
| 3.3.2. Tahap pelaksanaan..... | 15 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2. | Aktivitas Antibakterial Bakteri Asam Laktat terhadap Bakteri Patogen..... | 20 |
| 3.3. | Sensitivitas Bakteri Asam Laktat terhadap Antibiotik..... | 22 |
| 3.4. | Toleransi Bakteri Asam Laktat terhadap Media yang Berbeda | 24 |
| 3.4.1. | Media dengan pH yang berbeda..... | 24 |
| 3.4.2. | Media dengan konsentrasi garam empedu dan kadar garam (NaCl) yang berbeda | 24 |
| 3.4.3. | Media dengan suhu yang berbeda..... | 25 |
| 3.4.4. | Aktivitas enzim isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang..... | 27 |
| 3.5. | Identifikasi Biomolekuler Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang..... | 30 |
| 3.5.1. | Ekstraksi DNA | 30 |
| 3.5.2. | Amplifikasi dan Visualisasi DNA..... | 31 |
| 3.5.3. | Sekuensing DNA | 31 |
| 3.5.4. | Analisis Homologi | 32 |
| IV | POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK SECARA <i>IN VIVO</i> | 37 |
| 4.1. | Patogenitas Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang terhadap Ikan Nila | 37 |
| 4.2. | Daya Hambat dan Daya Lindung terhadap Bakteri <i>A. hydrophila</i> | 39 |
| 4.3. | Daya Hambat dan Daya Lindung Terhadap Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp..... | 41 |
| 4.4. | Pengaruh Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang terhadap Kinerja Pertumbuhan | 44 |
| 4.5. | Parameter Kualitas Air pada Media Pemeliharaan Ikan | 47 |
| V | EPILOG | 49 |
| | DAFTAR PUSTAKA | 50 |
| | UCAPAN TERIMA KASIH | 62 |
| | PROFIL PENULIS | 63 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|------------|--|----|
| Tabel 3.1. | Karakteristik Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang | 18 |
| Tabel 3.2. | Rata-Rata Diameter Zona Hambat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang terhadap Bakteri Patogen (mm)..... | 22 |
| Tabel 3.3. | Rata-Rata Diameter Zona Hambat pada Uji Sensitivitas Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang Terhadap Beberapa Jenis Antibiotik (mm)..... | 23 |
| Tabel 3.4. | Rata-Rata Nilai Densitas Optik (OD) Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang pada Media dengan Kadar pH dan Garam Empedu Berbeda | 25 |
| Tabel 3.5. | Rata-Rata Nilai Densitas Optik (OD) Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang pada Media dengan Suhu dan Kadar Garam Berbeda | 27 |
| Tabel 3.6. | Rata-Rata Indeks Hidrolisis Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang | 29 |
| Tabel 3.7. | Hasil Identifikasi Molekuler Tiga Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang | 32 |
| Tabel 3.8. | Fasta Sekuens DNA Bakteri Usus Ikan Repang | 33 |
| Tabel 4.1. | Kisaran Nilai Parameter Hematologis Ikan Nila (<i>O. niloticus</i>) Selama Pengamatan | 41 |
| Tabel 4.2. | Kisaran Nilai Parameter Hematologis Ikan Nila (<i>O. niloticus</i>) Selama Pengamatan | 44 |
| Tabel 4.3. | Nilai Rata-Rata Parameter Kinerja Pertumbuhan dan Pemanfaatan Pakan Ikan Nila (<i>O. niloticus</i>)..... | 46 |
| Tabel 4.4. | Kisaran Nilai Parameter Kualitas Air pada Media Pemeliharaan Ikan..... | 47 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|-------------|--|----|
| Gambar 1.1. | Ikan repang (<i>P. waandersi</i>) (Sumber: dokumen pribadi, 2021)..... | 4 |
| Gambar 3.1. | Morfologi koloni isolat bakteri asam laktata dari usus ikan repang (<i>P. waandersi</i>): (A) isolat R2, (B) isolat R3 dan (c) isolat R5..... | 17 |
| Gambar 3.2. | Aktivitas antibakterial bakteri asam laktat dari usus ikan repang terhadap bakteri patogen: (A) <i>A. hydrophila</i> , (B) <i>Pseudomonas</i> sp., (C) <i>E. ictaluri</i> | 20 |
| Gambar 3.3. | Sensitivitas isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang (<i>P. waandersi</i>) terhadap antibiotik: (A) isolat R1, (B) isolat R4, (C) isolat R5..... | 23 |
| Gambar 3.4. | Zona bening yang dihasilkan pada uji aktivitas enzimatis bakteri asam laktat dari usus ikan repang: (A) Amylolitik, (B) Proteolitik, (C) Lipolitik..... | 29 |
| Gambar 4.1. | Tingkat kelangsungan hidup ikan nila (<i>O. niloticus</i>) pada uji patogenitas..... | 38 |
| Gambar 4.2. | a. Tingkat kelangsungan hidup ikan nila (<i>O. niloticus</i>) pada akhir pengamatan, b. Jumlah bakteri <i>A. hydrophila</i> dalam darah ikan nila (<i>O. niloticus</i>)..... | 40 |
| Gambar 4.3. | a. Tingkat kelangsungan hidup ikan nila (<i>O. niloticus</i>) pada akhir pengamatan, b. Jumlah bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. dalam darah ikan nila (<i>O. niloticus</i>)..... | 43 |

I

PROLOG

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 komoditas 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, di antaranya ikan repan (*Puntiplites waandersi*) yang termasuk dalam kelompok ikan Cyprinids. Berdasarkan kebiasaan makanannya ikan repan digolongkan sebagai ikan omnivora atau ada kecenderungan untuk makan beragam jenis makanan. Menurut Utomo *et al.* (2010) pakan alami ikan repan atau cipuk adalah tumbuhan, bentos, 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 dan 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 respons 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 di antara 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 respons imunitasnya dalam menghadapi infeksi patogen. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kelompok bakteri asam laktat memiliki 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 kajian potensi bakteri asam laktat yang berasal dari usus ikan repang perlu disampaikan kepada masyarakat terutama masyarakat pembudidaya ikan dan pihak lain yang terkait.

II

DISKUSI WACANA

2.1. 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 standar 8,5 cm, 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 keperakan, punggung berwarna hijau kecokelatan. Garis rusuk lengkap, jari-jari tidak bercabang yang terakhir dari sirip punggung bertulang. Jari-jari bertulang sirip punggung sebelah ke belakang 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).



Gambar 1.1. Ikan repang (*P. waandersi*) (Sumber: dokumen pribadi, 2021)

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

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

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Actinopterygii
Ordo : Cypriniformes
Famili : Cyprinidae
Genus : *Puntioplites*
Spesies : *Puntioplites waandersi*.

2.2. Bakteri Patogen pada Ikan Air Tawar

2.2.1. Bakteri *Aeromonas hydrophila*

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 stres 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).

2.2.2. Bakteri *Pseudomonas* sp.

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 di mana 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.

2.2.3. Bakteri *Edwardsiella ictaluri*

Bakteri *E. 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 10^3 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).

2.3. Bakteri Asam Laktat sebagai Probiotik dalam Akuakultur

2.3.1. Bakteri Asam Laktat dan Manfaatnya Bagi Organisme Akuatik

Komunitas mikrob 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 respons 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 (BAL) diklasifikasikan dalam filum Firmicutes, kelas Bacillus, dan ordo Lactobacillales. 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 mikrob 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).

Pemanfaatan bakteri asam laktat (BAL) sebagai probiotik dalam budidaya organisme akuatik terutama ikan sudah banyak dilakukan, beberapa manfaat BAL sebagai probiotik meningkatkan pemanfaatan pakan, meningkatkan kinerja pertumbuhan dan meningkatkan resistensi terhadap penyakit (Ringo *et al.*, 2020).

1. Probiotik meningkatkan pemanfaatan pakan

Banyak penelitian baru-baru ini dilakukan pergantian pola enzim sebagai konsekuensi dari konsumsi BAL pada kerang dan ikan. Baru-baru ini, inklusi pakan *Lactobacillus* sp. dan *Lb. pentosus* pada konsentrasi 10^7 dan 5×10^8 CFU per g meningkatkan beberapa enzim pencernaan udang putih (*Litopenaeus vannamei*) (Du *et al.* 2019; Zuo *et al.* 2019). Demikian pula, peningkatan protease, amilase dan alkaline phosphatase diamati pada lobster (*Astacus leptodactylus*) diberi makan *Lb. plantarum*

pada konsentrasi 10^7 , 10^8 dan 10^9 CFU per g (Valipour *et al.* 2019). Dawood *et al.* (2019) melaporkan bahwa penggabungan *Lb. plantarum* pada 50, 100 atau 1000 mg/kg

secara signifikan meningkatkan amilase, lipase dan aktivitas protease ikan nila (*O. niloticus*). Peningkatan signifikan dalam lipase, amilase, tripsin, basa aktivitas fosfatase dan protease juga dicatat secara umum ikan mas (*Cyprinus carpio*), flounder zaitun (*Paralichthys olivaceus*) dan ikan rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

2. Probiotik meningkatkan kinerja pertumbuhan

Probiotik adalah salah satu cara yang paling menjanjikan untuk mempertahankan

pertumbuhan normal, kesehatan dan kesejahteraan ikan budidaya dan kerang karena berfungsi sebagai sumber nutrisi, vitamin dan enzim pencernaan, dan mereka akan secara signifikan berkontribusi terhadap konsumsi pakan, penyerapan nutrisi dan laju pertumbuhan inang (Nath *et al.* 2019). Konsumsi probiotik telah mampu untuk meningkatkan nafsu makan inang atau meningkatkan daya cerna organisme dengan merangsang ekskresi enzim pencernaan dan mempertahankan keseimbangan mikrob usus, yang menyebabkan perbaikan penyerapan nutrisi dan pemanfaatan, serta kelangsungan hidup dan pertumbuhan inang. Sebagian besar penelitian menggunakan BAL pada kerang berfokus pada kinerja pertumbuhan dan tingkat kelangsungan hidup. *Lb. pentosus* dan *Lb. plantarum* dimasukkan dalam diet udang putih secara signifikan peningkatan kinerja pertumbuhan dan pemanfaatan pakan (Zheng *et al.* 2018).

3. Probiotik meningkatkan resistensi terhadap penyakit

Probiotik telah terbukti sebagai alat yang efektif untuk penyakit pencegahan dalam akuakultur (Hoseinifar *et al.* 2018; Ringø *et al.* 2018). Probiotik dapat berinteraksi dengan atau melawan bakteri enterik lainnya dengan melawan kolonisasi atau dengan langsung menghambat dan mengurangi kejadian patogen oportunistik (Chiu *et al.* 2017). Mereka juga bisa meningkatkan kesehatan dan kesejahteraan inang melalui fisiologis atau modulasi imun (Butt dan Volkoff 2019). Probiotik dapat menghasilkan molekul efektif yang aktivitasnya bersifat bakterisida pada bakteri patogen usus inang, menghalangi proliferasi patogen oportunistik (Seghouani *et al.* 2017).

Pemberian probiotik tergantung pada beberapa faktor yaitu probiotik yang digunakan, bentuk suplementasi, tingkat dosis dan durasi aplikasi, dan beberapa model pemberian yang berbeda yaitu:

a. Pemberian oral melalui pakan maupun perendaman.

Pemberian melalui diet atau pakan adalah metode yang paling banyak digunakan. Probiotik dan komponen dinding sel (parabiotik)

diterapkan dalam pakan, atau ditambahkan ke tangki atau kolam air untuk memberikan perlindungan terhadap infeksi. Pada larva ikan dan kerang, makanan hidup (misal *Artemia*) telah diteliti menjadi pembawa probiotik yang efisien.

b. Administrasi beberapa probiotik dalam kombinasi.

Dalam ulasannya, "Probiotik pada manusia dan hewan," Fuller (1989) menulis, "Persiapan probiotik dapat terdiri dari *strain* tunggal atau mungkin mengandung sejumlah sampai delapan *strain* bakteri." Namun, sejak awal 1990-an kebanyakan studi akuakultur menggunakan administrasi tunggal, tetapi selama tahun-tahun terakhir, suplementasi probiotik campuran dalam diet telah mendapatkan diminati oleh para peneliti. Keuntungan dari preparasi *multiple-strain* adalah; mereka aktif terhadap berbagai kondisi yang lebih luas dan spesies ikan.

c. Bakteri yang tidak aktif.

Misalnya pemberian secara oral *Lactobacillus delbrueckii* yang tidak aktif akibat panas dan *Bacillus subtilis*, secara individu atau gabungan.

d. Spora membantu bakteri untuk bertahan hidup dengan menjadi resistan terhadap perubahan ekstrem di habitat bakteri termasuk suhu ekstrem, kurangnya kelembaban/kekeringan, atau terpapar bahan kimia dan radiasi. Spora bakteri juga dapat bertahan hidup pada tingkat nutrisi yang rendah, dan bakteri probiotik pembentuk spora telah diterima dengan meningkatnya minat ilmiah dan komersial.

e. Budidaya, penyimpanan dan pemberian.

Probiotik biasanya ditambahkan ke pakan sebagai kultur beku-kering, dan terkadang dicampur dengan lipid.

f. Liofilisasi atau pengeringan beku, adalah proses dehidrasi dengan suhu rendah, yang melibatkan pembekuan produk pada tekanan rendah, dan menghilangkan es dengan sublimasi. Metode ini digunakan dalam studi probiotik ikan bersirip dan kerang.

g. Pemberian secara terus menerus atau berkala? Sebagian besar penelitian yang dilakukan terus memberi makan ikan untuk rentang waktu yang luas, bervariasi dari 15 sampai 94 hari (Hai, 2015).

Penerapan terus-menerus dari BAL, basil, dan bakteri Gram-negatif tertentu meningkatkan kolonisasi bakteri tambahan, dan memodulasi populasi mikrob di saluran pencernaan. Namun, muncul pertanyaan penting; apakah probiotik secara permanen berkolonisasi di saluran pencernaan?

- h. Pemberian bersama probiotik dengan prebiotik atau produk tanaman Ringo *et al.*, 2020).

2.3.2. 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 mikrob 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).

Probiotik adalah salah satu cara yang paling menjanjikan serta aman untuk mendukung pertumbuhan normal serta kesehatan ikan budidaya karena mereka berfungsi sebagai sumber nutrisi, vitamin dan enzim pencernaan, dan secara signifikan berkontribusi pada konsumsi pakan, penyerapan nutrisi dan tingkat pertumbuhan inang (Nath *et al.*, 2019). Konsumsi probiotik berdampak pada meningkatnya nafsu makan atau daya cerna organisme dengan merangsang ekskresi enzim pencernaan dan mempertahankan keseimbangan mikrob usus, yang menyebabkan perbaikan penyerapan dan pemanfaatan unsur hara, serta kelangsungan hidup dan pertumbuhan inang (Ringø *et al.*, 2020).

Diketahui bahwa beberapa *strain* bakteri asam laktat dapat melindungi ikan dari patogen usus dengan beberapa mekanisme yang mungkin, termasuk produksi zat penghambat, seperti asam organik, hidrogen peroksida, bakteriosin, dan karbon peroksida (Ringø *et al.*, 2020). Mekanisme yang ditunjukkan melalui pemanfaatan nutrisi yang lebih baik dan karena sifat antibakterinya, serta meningkatkan respons imunnya dalam menghadapi infeksi patogen, di antaranya adalah *Lactococcus*

lactis, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus plantarum* dan *Leuconostoc mesenteroides* (Ringø *et al.*, 2018). Di antara probiotik, kelompok Lactobacilli dianggap sebagai salah satu pengganti antibiotik yang paling efektif (van Doan *et al.*, 2020).

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 amfilik 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 mikrob 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).

III

POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI USUS IKAN REPANG SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK SECARA *IN VITRO*

Kegiatan penapisan bakteri asam laktat dari usus ikan repang untuk mengetahui potensinya sebagai kandidat probiotik secara *in vitro* dilakukan dalam beberapa tahapan dan diuraikan seperti di bawah ini.

3.1. Isolasi dan Karakterisasi Biokimia Bakteri Asam Laktat

Pada tahap isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari usus ikan repang sebagai kandidat probiotik dilakukan beberapa uji sebagai berikut:

3.3.1. 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 *styrofoam* dan di sekeliling plastik diletakkan 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.

3.3.2. Tahap pelaksanaan

a. Isolasi bakteri asam laktat dari usus ikan repang

Isolasi bakteri asam laktat dari usus ikan repang menggunakan desain survei dengan mengeksplorasi sepuluh sampel usus ikan repang untuk mendapatkan isolat murni bakteri asam laktat. 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 mikrob. 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).

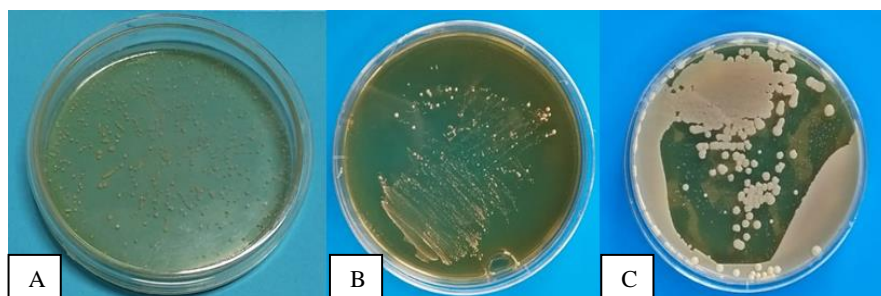
Bakteri asam laktat merupakan kelompok mikrobiota usus normal yang tidak dominan, dengan kemampuan menghambat pertumbuhan beberapa *strain* bakteri patogen. Selain menjadi grup yang tidak dominan, umumnya bakteri ini juga membutuhkan nutrisi tertentu dalam media kultur untuk pertumbuhannya. Oleh sebab itu, isolasi BAL menggunakan media kultur spesifik berupa agar MRS, walaupun ada beberapa jenis bakteri gram positif lain berpotensi tumbuh pada media tersebut.

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

Lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dengan kode P1, P2, P3, P4 dan P5 selanjutnya dikarakterisasi atau diidentifikasi berdasarkan sifat kimiawinya. Uji karakterisasi biokimia isolat bakteri asam laktat ini menggunakan desain survei dengan mengeksplorasi sepuluh sampel usus ikan repang. 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).

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 5.1. 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 3.1).



Gambar 3.1. 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 *Lactobacilus* 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.

Komposisi BAL dalam saluran pencernaan ikan air tawar erat kaitannya dengan faktor diet (ikan herbivor, karnivor dan omnivor) dan suhu lingkungan. Mikrobiota saluran pencernaan ini berperan dalam pemanfaatan nutrisi, pertumbuhan, kesehatan dan tingkat kelangsungan hidup ikan sebagai inangnya. Beberapa bakteri yang spesifik, seperti BAL mampu memecah molekul kompleks seperti polisakarida, protein, lemak dan asam nukleat dari makanan menjadi molekul yang lebih sederhana.

Tabel 3.1. 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> |

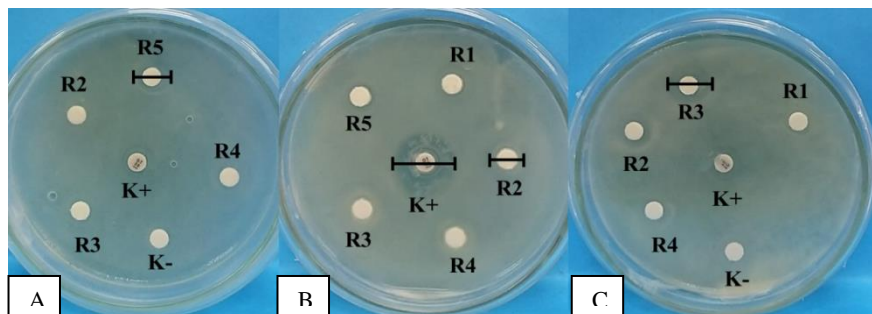
Karakteristik bakteri asam laktat genus *Enterococcus* yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan rejang yaitu, morfologi sel berbentuk bulat berantai, gram positif terhadap pewarnaan, bereaksi negatif terhadap uji katalase, non-motil dan memproduksi asam dari fermentasi karbohidrat jenis laktosa. Hasil 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 rejang 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 rejang, 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 rejang sebagai bakteri gram *negative*, non-motil dan 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).

3.2. Aktivitas Antibakterial Bakteri Asam Laktat terhadap Bakteri Patogen

Pada uji ini digunakan 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). Bakteri asam laktat yang diisolasi dari usus ikan repanng 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 repanng diletakkan di atas media MRSA 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*.



Gambar 3.2. Aktivitas antibakterial bakteri asam laktat dari usus ikan repanng terhadap bakteri patogen: (A) *A. hydrophila*, (B) *Pseudomonas* sp., (C) *E. ictaluri*

Lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repan, 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 3.2 dan Tabel 3.2). 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).

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 5.2).

Aktivitas antagonisme adalah salah satu kriteria penting untuk pemilihan probiotik. Pada umumnya bakteri asam laktat menghasilkan beberapa zat antimikrob di antaranya asam organik, bakteriosin, diasetil dan hidrogenperoksida, yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain. Beberapa peneliti mengenai penapisan probiotik secara *in vitro* menjadikan parameter aktivitas antagonisme terhadap beberapa *strain* bakteri patogen sebagai kriteria awal dan utama, sebelum melanjutkan pada parameter yang lain.

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 repan, 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 3.2. Rata-Rata Diameter Zona Hambat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang terhadap Bakteri Patogen (mm)

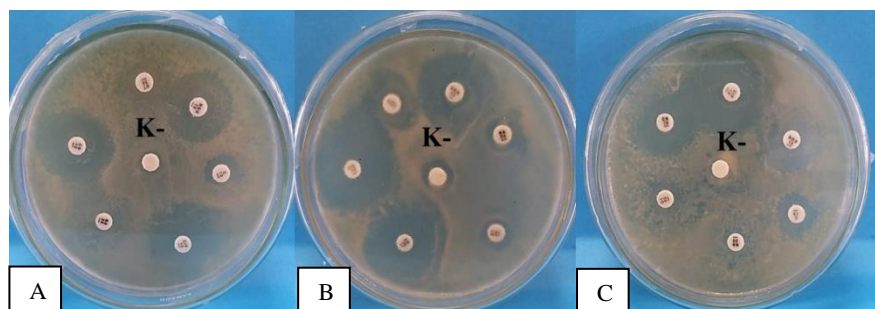
| Isolat | Bakteri Patogen | | | Rata-rata |
|--------|----------------------|------------------------|--------------------|-----------|
| | <i>A. hydrophila</i> | <i>Pseudomonas sp.</i> | <i>E. ectaluri</i> | |
| R1 | 11,67 | 10,00 | 11,33 | 11,00 |
| R2 | 12,33 | 13,67 | 11,00 | 12,33 |
| R3 | 12,00 | 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 |

3.3. Sensitivitas Bakteri Asam Laktat terhadap Antibiotik

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). Tahap uji ini menggunakan teknik difusi sesuai metode Patel *et al.* (2020). Lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang dinokulasikan ke dalam media MRSA dan dibiarkan mengering sekitar satu 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.

Isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang menunjukkan tingkat sensitivitas yang berbeda terhadap beberapa jenis antibiotik pada penelitian ini (Gambar 3.3 dan Tabel 3.3). Berdasarkan Mayer (2007), sensitivitas isolat bakteri terhadap antibiotik dikategorikan dalam tiga kelompok, yaitu kisaran zona hambat ≤ 13 mm sebagai resistan, 14-18

sebagai *intermediet* dan ≥ 19 mm sebagai rentan atau sensitif. 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.



Gambar 3.3. Sensitivitas isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang (*P. waandersi*) terhadap antibiotik: (A) isolat R1, (B) isolat R4, (C) isolat R5

Tabel 3.3. 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=resistan, I=intermediet, S=sensitif/rentan

Seluruh isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang resistan terhadap antibiotik Oxytetracycline dan Nalidix Acid, sedangkan terhadap antibiotik Norfloxacin, Chloramphenicol dan Gentamycin tergolong intermediet sampai sensitif. 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, resistensivitas isolat tersebut bisa menjadi keuntungan. Walaupun demikian, ditemukan juga beberapa isolat bakteri asam laktat dari usus ikan yang sensitif terhadap beberapa jenis antibiotik (Hanol *et al.*, 2020). Ikan rejang 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 sensitif terhadap antibiotik, hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Agustina *et al.* (2018), pada ikan kelabau.

3.4. Toleransi Bakteri Asam Laktat terhadap Media yang Berbeda

Uji toleransi terhadap pH media, kadar garam (NaCl), garam empedu dan suhu media isolat bakteri asam laktat dari usus ikan rejang menggunakan desain eksperimental laboratorium dengan lima perlakuan dan tiga ulangan.

3.4.1. Media dengan pH 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 diinkubasi pada 37 °C selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri diamati dengan menilai kekeruhan (densitas optik) dengan menggunakan spektrofotometer 600 nm.

3.4.2. Media dengan konsentrasi garam empedu dan kadar garam (NaCl) yang berbeda

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.

3.4.3. Media dengan suhu yang berbeda

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 metode Risna *et al.*, 2020).

Isolat bakteri asam laktat diuji kemampuannya dalam mentoleransi beberapa media tanam dan menunjukkan kemampuan toleransi yang berbeda (Tabel 3.4 dan 3.5). 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 3.4. 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 |

Pada Tabel 3.4 dapat dilihat bahwa lima isolat bakteri asam laktat yang berasal dari usus ikan repanq 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), dengan kata lain tingkat kemampuannya dalam mempertahankan kelangsungan hidup di dalam saluran pencernaan ikan yang ada dalam kondisi keasaman yang tinggi. 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 repanq 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 resistan terhadap bahan-bahan yang menghambat pertumbuhannya di dalam saluran pencernaan, seperti garam empedu (Allameh *et al.*, 2012; Prabhurajeshwar *and* Chandrakanth, 2017).

Tabel 3.5. Rata-Rata Nilai Densitas Optikal (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 |

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.

3.4.4. Aktivitas enzim isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang

Uji aktivitas enzimatik isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang menggunakan desain ekperimental laboratorium dengan lima perlakuan dan tiga ulangan. Pada uji aktivitas enzim amilase atau aktivitas amilolitik, lima isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang 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.

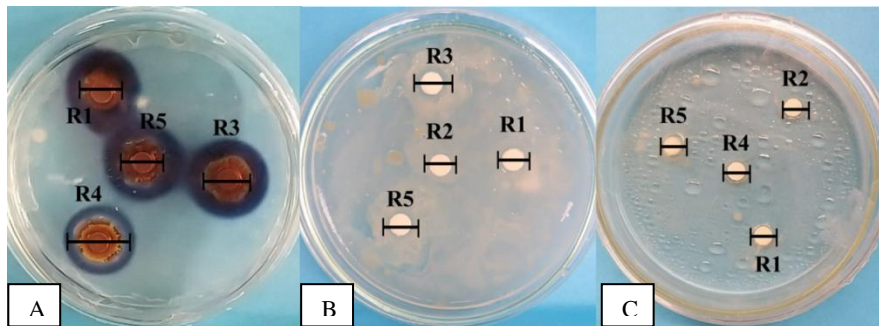
Pada uji aktivitas lipolitik atau aktivitas enzim lipase dilakukan dengan penambahan 2 mL minyak zaitun dalam 100 mL media MRSA. Biakan cair isolat bakteri asam laktat yang sebelumnya sudah diinkubasi dalam media MRSB selama 24 jam diteteskan pada *paper disk* steril lalu diletakkan di atas media MRSA 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).

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 3.6 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 mikrob dalam meningkatkan pencernaan nutrisi inang.

Tabel 3.6. 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 amilase, 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 3.4. Zona bening yang dihasilkan pada uji aktivitas enzimatik 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 repang di alam sebagai ikan omnivor yang mengkonsumsi beragam jenis makanan seperti tumbuhan dan zoobenthos sebagai makanan utama, dan makanan pelengkap berupa serangga, sedangkan makanan tambahan berupa plankton dan cacing (Kaban *et al.*, 2016). Saluran pencernaan ikan mengandung populasi mikrob dari lingkungan akuatik, yaitu air dan makanan (Ganguly *and* Prasad, 2012). Indeks hidrolisis amilolitik dan proteolitik bakteri asam laktat dari usus ikan repang pada penelitian ini lebih tinggi dibanding pada penelitian Mulyasari *et al.* (2016) yang menguji aktivitas enzimatis bakteri dari usus ikan gurami. Enzim ekstraselular yang dihasilkan BAL mampu memecah selulosa, pati, protein dan lipid. *L. lactis* dan *Lp. plantarum* menunjukkan aktivitas enzimatis yang bervariasi, di masa yang akan datang penting menjadi pertimbangan sebagai probiotik dalam kegiatan budidaya organisme akuatik.

3.5. Identifikasi Biomolekuler Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang

Identifikasi biomolekuler isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang menggunakan desain survei dengan mengeksplorasi tiga isolat terbaik dari tahapan uji sebelumnya. Identifikasi lima isolat bakteri asam laktat yang bersifat antibakterial secara *in vitro* dilakukan dengan Analisis Gen 16S rRNA. Tahapan identifikasi diuraikan sebagai berikut:

3.5.1. 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 µl aquabides, kemudian ditambahkan 1 mL saponin 0,5% dan didiamkan selama 24 jam pada suhu 4 °C. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, supernatan hasil sentrifugasi dibuang. Sebanyak 1 mL *Phospate 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 µl aquabides dan 50 µl 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.

3.5.2. 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 °C selama 1 menit, kemudian sebanyak 35 siklus - denaturasi pada suhu 95 °C selama 15 detik, *annealing* pada suhu 55 °C selama 15 detik. Ekstensi pada suhu 72 °C selama 10 detik dan final ekstensi pada suhu 72 °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*.

3.5.3. 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 disekuencing menggunakan primer 27F dan 1492 R. Sekuencing dianalisis secara otomatis (ABI 3130XL, *Applied Biosystem*).

3.5.4. Analisis Homologi

Analisis sekuencing DNA isolat bakteri terbaik kemudian dibandingkan dengan sekuencing DNA pada basis data (*database*) DNA. Penelusuran dilakukan dengan menggunakan internet melalui program pelacakan *database Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada *National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health, USA*, data penelitian yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan menggunakan metode deskriptif. Hasil sekuencing dianalisis menggunakan BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Isolat bakteri asam laktat dari usus ikan repang 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 3.7 dan Tabel 3.8).

Tabel 3.7. Hasil Identifikasi Molekuler Tiga Isolat Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang

| No. | Kode sampel | Nama hasil blast | Accession number | Panjang sekuencing (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 3.8. Fasta Sekuens DNA Bakteri Usus Ikan Repang

| No. | Kode Sampel | Basa Nitrogen Hasil Sekuens |
|-----|-------------|--|
| 1. | R2 | <p>ACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCCGAGTGCTTGCACTC AATTGGGAAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG GTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAAACAGTG CTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGA AAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCA TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGC ATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTTC GGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTG AAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAA CAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACC AGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATAC GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGA GCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTC AACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTGGAGTGCAG AAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCT GTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA AGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCA TTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA CATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGAC AAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGCTG AGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATTGT TAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGGAGACTGCCGGT GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTA CAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAG CTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAA GCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAA TACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAG AGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCC AGCCGCTAAGGT</p> |
| 2. | R3 | <p>TATACATGCAAGTCGAACGACACTCTGGTATGTGATTGGTGC TTGTCGATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGA GTAACACGTGGGAAACCTGCCATAAGCGGGGGATAACACCT GGCAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGTACCGCAT GGTCCGAGCTTGAACATGGCTTCTGCTATCACTTTTGGATGG TCCCAGCGGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGTACCA TGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCCGCCACA TTGGGACTGACACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAG TAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACG</p> |

| No. | Kode Sampel | Basa Nitrogen Hasil Sekuens |
|-----|----------------|--|
| | | CCGCGTGAGTGAAGAATGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTG TTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGAC GGTATTTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGG GCGTAAATCAAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAA GCCTTCGGCTCAACCGAAGAGATGCATCGGAAACTGAGAAAC TTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTATCGGTG AGATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGG CTGTCTGGTCTGTAAGTACGACGCTGAGAGCTCGAAAAGTATG TGGTAGCCCAACAGGATTTAGATACCCCTGGTAGCCATACC GTAAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTCTCCGCCCTTT CAGTGCTGGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCCGCTGGGGAG TACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC CGCACAAGCGGTGGGAGGCATGTGGTTTAATTTGAAGCTACG GGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAG AGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGTGGTGCA TGGTTGTGTCAGCTTGTGTTGTGAGATGTTGGGTTAAGTTC GCAACGAGCGCAACCCCTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTT GGGCCCTTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG TGGGGATGACGTCAAATCCTCAAGCCCCTTATGACCTGGGGT ACACACGTGCTACCAAGGATGGTACCACGAGGTGGGAACTCG CGAGAGTAAAGCTAATTTTTTAAAGCCATTTTCAGTTCGGATTG TAGGCTGCAACTTGCCCTACATGAAGTCGGAATCGTAGTAAT CGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG TACACACCGCCGTCACACCATGAGGAGTTTGTAACTACCCA GAAGTTCGGTGGCGTAACTGTCTAGGAACCCAGCCTTGCCT TAAGGTT |
| 3. | R5 | TACATGCAAGTTGAGCGCTGAAAGTTGGTACTTGTACCGACT GGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACCGGTGGGGAATCTGC CTTTGAGCGGGGGACAACATTTGGAAACGAATGCTAATACCG CATAAAAACTTTAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAGATGCAA TTGCATCACTCAAAGATGATCCCGGTTGTATTAGCTAGTTGG TGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTG AGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAA CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACG AAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTTC GGATCGTAAAACCTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAG TGGAAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCCAGAAAGGGAC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCG AGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGG TTTATTAAGTCTGGTGTAAAAGGCAGTGGCTCAACCATTGTAT GCATTGGAAAACCTGGTAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTG GAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGGAGGA ACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACACT GAGGCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGATGTAGGGAGC |

| No. | Kode Sampel | Basa Nitrogen Hasil Sekuens |
|-----|-------------|---|
| | | TATAAGTTCTCTGTATCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCC TGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAG CAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATACTCGTGCTAT TCCTAGAGATAGGAAGTTCCTTCGGGACACGGGATACAGGTG GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAA GTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATA AGTTGGGCACTCTAACGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGA AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAGA CAGTGATGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCATTTCTCAGTTCGGA TTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGT AATCGGGATCAGCACGCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT TGTACACACCGCCGTCACACCACGGGAGTTGGGAGTACCCG AAGTAGGTGCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTCTTAA |

Enterococcus faecalis merupakan spesies dari genus *Enterococcus* merupakan bakteri asam laktat yang ditemukan sebagai bakteri indigenus 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). Spesies dalam genus atau genera *Enterococcus* yang penting dan banyak digunakan sebagai probiotik maupun meningkatkan sistem imunitas adalah *E. faecium* dan *E. faecalis*.

Di antara BAL, salah satu spesies yang lebih fleksibel dan menjanjikan adalah *Lactobacillus plantarum* atau, seperti yang baru-baru ini disebut, *Lactiplantibacillus (Lpb.) plantarum* berbentuk batang lurus (basil), gram positif, non-motil, bakteri nonspora, mikroaerofilik, mesofilik. Meskipun merupakan katalase negatif, beberapa galur yang tumbuh dalam kondisi khusus memiliki kandungan katalase dan magan sejati aktivitas pseudokatalase. Dinding sel mengandung jenis asam ribitol-atau glycerolteichoic, meskipun beberapa galur memiliki asam teikoat

yang tidak biasa. Peptidoglikan dinding selnya bertipe meso-diaminopimelic acid (DAP). Termasuk dalam kelompok dari basil heterofermentatif fakultatif, *Lpb.* strain *plantarum* memiliki gen pemanfaatan karbohidrat yang memungkinkan mereka untuk beradaptasi dengan lingkungan ekologi yang berbeda. Biasanya diisolasi dari makanan fermentasi, *Lpb. strain plantarum* dapat ditemui di berbagai niche, yang meliputi saluran pencernaan, tinja, makanan fermentasi, dan tumbuhan.

Lactiplantibacillus plantarum (sebelumnya dikenal sebagai *Lactobacillus plantarum*) beradaptasi di dalam usus ikan di antaranya 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 *Lp. 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 indigenous 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 mersaciacin (Parada *et al.*, 2007). Bakteri *L. lactis* menunjukkan aktivitas antibakterial terhadap beberapa *strain* patogen pada ikan, memiliki kemampuan bertahan dalam saluran pencernaan dengan kondisi asam dan garam empedu sehingga memiliki potensi dikembangkan sebagai probiotik pada ikan.

IV

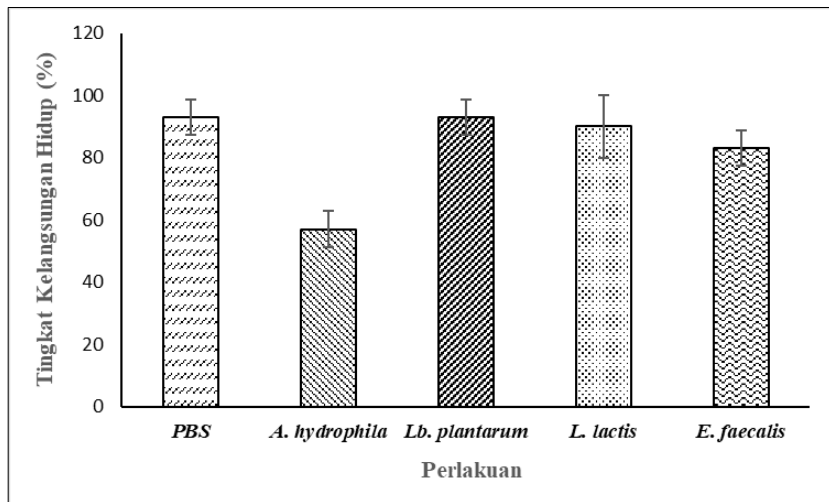
POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK SECARA *IN VIVO*

Penapisan bakteri asam laktat dari usus ikan kelabau yang berpotensi sebagai kandidat probiotik secara *in vivo* pada ikan diuraikan dalam beberapa tahap seperti di bawah ini.

4.1. Patogenitas Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Rebang terhadap Ikan Nila

Uji patogenitas tiga isolat bakteri asam laktat dari usus ikan rebang terhadap ikan nila secara ekperimental laboratorium dengan lima perlakuan dan tiga ulangan. Benih ikan nila yang sudah diadaptasikan lalu diinjeksi, masing-masing dengan larutan PBS sebagai kontrol negatif, *A. hydrophila* sebagai kontrol positif dan tiga BAL secara intramuscular dengan dosis 0,1 mL/ekor ikan dengan konsentrasi 10^6 cfu/mL. Ikan selanjutnya dipelihara selama tujuh hari untuk melihat tingkat kelangsungan hidupnya.

Uji patogenitas dilakukan untuk mengetahui tingkat keamanan bakteri asam laktat terhadap ikan. Tingkat keamanan ini menentukan apakah isolat bakteri tersebut bisa digunakan pada uji tahap selanjutnya atau tidak. Tingkat kelangsungan hidup benih ikan nila dalam uji patogenitas ini tertinggi pada perlakuan kontrol negatif (PBS) dan bakteri *Lb. plantarum* sebesar 93%, diikuti oleh *L. Lactis* dan *E. faecalis* masing-masing sebesar 90% dan 83%, sementara pada kontrol positif menggunakan bakteri *A. hydrophila* sebesar 57% (Gambar 4.1).



Gambar 4.1. Tingkat kelangsungan hidup ikan nila (*O. niloticus*) pada uji patogenitas

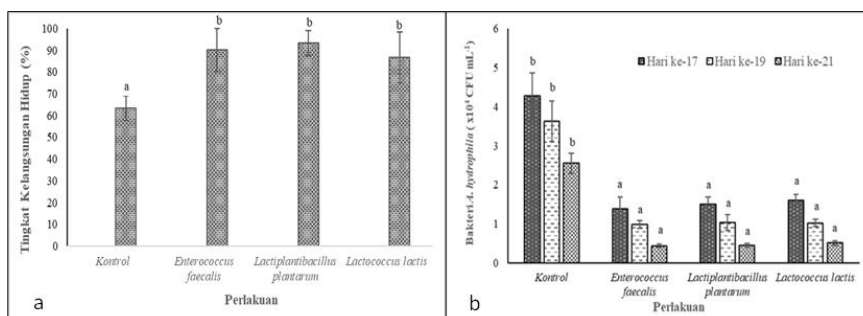
Produk berupa bakteri potensial probiotik dapat dihasilkan setelah dilakukan serangkaian uji lanjutan secara *in vivo*. Uji patogenitas bakteri usus yang menunjukkan kemampuan menghambat bakteri patogen secara *in vitro* perlu dilakukan lebih lanjut, untuk menjamin keamanan kandidat probiotik. Oleh karena itu, perlu dilakukan evaluasi non-patogenitasnya pada inang (Giri *et al.*, 2012). Tingkat kelangsungan hidup ikan nila pada uji patogenitas bakteri asam laktat dari usus ikan repang menunjukkan kisaran yang lebih tinggi jika dibanding penelitian serupa pada ikan kelabau yang berkisar antara 37-93% (Agustina *et al.*, 2019). Tingkat kelangsungan hidup ikan nila paling rendah setelah diinjeksi bakteri patogen *A. hydrophila*, menunjukkan bahwa bakteri ini memang memiliki virulensi yang tinggi pada benih ikan nila. Adanya senyawa berupa enzim maupun toksin pada bakteri ini berdampak pada menurunnya daya tahan ikan. Hasil uji patogenitas bakteri asam laktat dengan kisaran tingkat kelangsungan hidup sebesar 83-93% menunjukkan bahwa ketiga bakteri ini bisa digunakan pada uji selanjutnya untuk mendapatkan kandidat probiotik yang potensial.

4.2. Daya Hambat dan Daya Lindung terhadap Bakteri *A. hydrophila*

Uji ini merupakan uji eksperimental laboratorium dengan masing-masing empat perlakuan dan tiga ulangan. Uji secara *in vivo* terhadap bakteri patogen, *A. hydrophila*. Benih ikan nila (*O. niloticus*) masing-masing sebanyak 10 ekor dengan berat rata-rata $3,38 \pm 0,09$ g dipelihara dalam akuarium volume 30 L dan diberi pakan BAL yaitu *E. faecalis*, *Lp. plantarum* dan *L. lactis* dengan dosis 0.1 mL/g pakan dengan konsentrasi 10^6 cfu/mL dan larutan Phosphate Buffer Saline sebagai kontrol. Ikan diberi pakan secara at satiation sebanyak tiga kali sehari selama 14 hari, perlakuan diberikan pada pagi hari. Pada hari ke-15, ikan diuji tantang masing-masing dengan *A. hydrophila* pada konsentrasi 10^6 cfu/mL secara injeksi intramuskular dengan dosis 0,1 mL kemudian dipelihara hingga hari ke-21.

Kemampuan bakteri asam laktat dari usus ikan repang dalam melindungi ikan terhadap infeksi bakteri *A. hydrophila* ditunjukkan dengan tingkat kelangsungan hidup yang lebih tinggi dibanding perlakuan kontrol ($P < 0,05$). Pada Gambar 4.2, tingkat kelangsungan hidup benih ikan nila yang diberi pakan dengan bakteri asam laktat berkisar antara 87-93%, sementara kontrol sebesar 63%. Kondisi ini sejalan dengan kemampuan menghambat bakteri *A. hydrophila* secara *in vivo* ditunjukkan dengan jumlah bakteri patogen tersebut di dalam darah ikan nila yang lebih rendah secara signifikan dibanding dengan kontrol ($P < 0,05$). Jumlah bakteri *A. hydrophila* pada perlakuan probiotik pada akhir perlakuan masing-masing 0,44; 0,45 dan $0,51 \times 10^4$ cfu/mL untuk perlakuan *E. faecalis*, *Lp. plantarum* dan *L. lactis*, sementara pada kontrol $2,55 \times 10^4$ cfu/mL.

Pada penelitian Zhu *et al.* (2021), eksperimen uji tantang menunjukkan bahwa ikan dalam kelompok *L. lactis* 3-c-18 memiliki tingkat kematian yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Ini kemungkinan terkait dengan kombinasi peningkatan kesehatan hati dan usus, peningkatan kapasitas antioksidan darah, dan meningkatkan flora usus karena dimasukkannya *L. lactis* 3-c-18 dalam pakan.



Gambar 4.2. a. Tingkat kelangsungan hidup ikan nila (*O. niloticus*) pada akhir pengamatan, b. Jumlah bakteri *A. hydrophila* dalam darah ikan nila (*O. niloticus*)

Uji skrining BAL secara *in vivo* penting dilakukan untuk membuktikan hasil yang sudah diperoleh secara *in vitro*. Selain itu, skrining *in vivo* berguna untuk membuktikan peran penting bakteri probiotik dalam saluran pencernaan dalam pertahanan melawan invasi patogen serta stimulasi sistem imunitas inang.

Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa penggunaan mikroorganisme hidup memberikan manfaat kesehatan bagi inang ketika tertelan dalam jumlah yang cukup. Mirip dengan pencernaan mamalia, usus ikan juga menyediakan niche untuk pelekatan, kolonisasi, dan proliferasi banyak spesies mikrob yang memengaruhi berbagai proses fisiologi inangnya. Mikrobiota usus memainkan peran penting dalam sistem kekebalan tubuh, memodulasi kematangan jaringan limfoid yang terkait dengan usus dan bertindak sebagai penghalang beberapa mikroorganisme patogen. Pada ikan, permukaan mukosa usus membentuk sistem pertahanan pertama terhadap invasi patogen, dengan adanya limfosit B dan T, makrofag, sel dendritik dan goblet, granulosit dan sel mast dengan butiran eosinofilik (Lazado dan Caipang, 2014; Nayak, 2010).

Pada Tabel 4.1 parameter hematologis masih berada dalam kisaran yang normal (Salasia *et al.*, 2001), hal ini menunjukkan bahwa pemberian bakteri asam laktat selama 14 hari tidak menyebabkan gangguan kesehatan pada ikan. Jumlah sel leukosit dan diferensial leukosit mengalami

peningkatan dengan pemberian bakteri asam laktat menjadi indikasi terbentuknya respons imunitas non spesifik pada ikan nila. Hal ini sejalan dengan penelitian pada ikan shabout (*Tor grypus*) yang mengkonsumsi bakteri autochthonous *Lactobacillus casei* PTCC1608 (5×10^7 cfu/g) selama 60 hari terlihat peningkatan yang signifikan dalam jumlah sel darah putih dan konsentrasi hemoglobin (Muhammadian *et al.*, 2018).

Tabel 4.1. Kisaran Nilai Parameter Hematologis Ikan Nila (*O. niloticus*) Selama Pengamatan

| Parameter Parameters | Perlakuan Treatments | | | |
|---|-------------------------|--|--|--------------------------------------|
| | Kontrol Control | <i>E. faecalis</i> <i>E. faecalic</i> | <i>Lp. plantarum</i> <i>Lp. plantarum</i> | <i>L. lactis</i> <i>L. lactis</i> |
| Hemoglobin (g/dL) | 6,33-7,70 | 6,77-8,33 | 7,40-9,17 | 6,17-8,33 |
| Hematokrit (%) | 11,12-22,98 | 22,53-28,22 | 22,98-37,69 | 19,06-22,98 |
| Eritrosit ($\times 10^6$ sel mm^3) | 0,81-1,57 | 1,40-1,78 | 1,57-2,68 | 1,22-1,57 |
| Leukosit ($\times 10^4$ sel mm^3) | 0,99-1,59 | 1,55-1,86 | 1,55-2,0 | 1,43-1,57 |
| Limfosit (%) | 75,87-81,93 | 77,71-83,44 | 78,27-83,44 | 73,87-82,34 |
| Monosit (%) | 13,50-19,36 | 13,02-19,36 | 10,03-19,36 | 12,22-21,53 |
| Neutrofil (%) | 2,37-7,04 | 2,37-4,60 | 2,37-4,46 | 2,37-6,18 |

4.3. Daya Hambat dan Daya Lindung Terhadap Bakteri *Pseudomonas sp.*

Uji ini merupakan uji eksperimental laboratorium dengan masing-masing empat perlakuan dan tiga ulangan. Uji secara *in vivo* terhadap bakteri patogen, *Pseudomonas sp.* Benih ikan nila (*O. niloticus*) masing-masing sebanyak 10 ekor dengan berat rata-rata $3,38 \pm 0,09$ g dipelihara dalam akuarium volume 30 L dan diberi pakan BAL yaitu *E. faecalis*, *Lp. plantarum* dan *L. lactis* dengan dosis 0.1 mL/g pakan dengan konsentrasi 10^6 cfu/mL dan larutan Phosphate Buffer Saline sebagai kontrol. Ikan diberi pakan secara *at satiation* sebanyak tiga kali sehari selama 14 hari, perlakuan diberikan pada pagi hari. Pada hari ke-15, ikan diuji tantang masing-masing dengan *Pseudomonas sp.* pada konsentrasi 10^6 cfu/mL secara injeksi intramuskular dengan dosis 0,1 mL kemudian dipelihara hingga hari ke-21.

Kemampuan bakteri asam laktat dari usus ikan repang dalam melindungi infeksi bakteri *Pseudomonas sp.* ditunjukkan pada Gambar 4.3

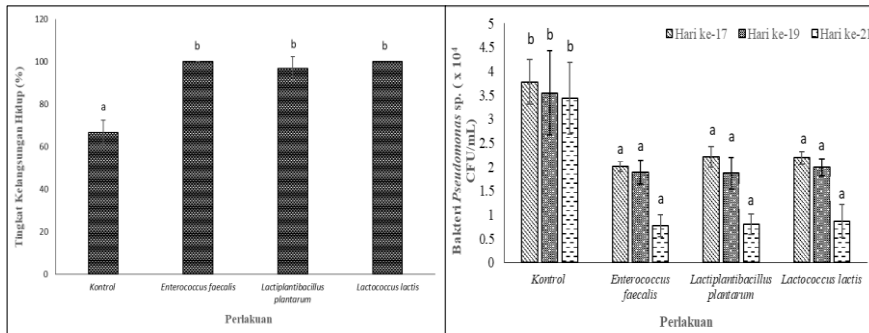
(a) dan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* sp. secara *in vivo* dapat dilihat pada Gambar 4.3. (b). Tiga isolat BAL yaitu *E. faecalis*, *Lp. plantarum* dan *L. lactis* menunjukkan daya hambat dan daya lindung yang lebih baik dibanding perlakuan kontrol, hal ini terlihat pada tingkat kelangsungan hidup yang berkisar antara 96,67-100% sedangkan kontrol sebesar 66,67%. Sifat antibakterial dari ketiga BAL tersebut ditunjukkan dengan jumlah bakteri *Pseudomonas* sp. yang lebih rendah dalam darah ikan.

Probiotik telah terbukti efektif dimanfaatkan untuk mencegah penyakit dalam akuakultur. Probiotik bisa berinteraksi dengan atau bakteri enterik yang bersifat antagonistik dengan melawan kolonisasi atau secara langsung menghambat dan mengurangi insidensi dari patogen oportunistik. Selain itu probiotik juga mampu meningkatkan kesehatan inang, kondisi fisiologis serta memodulasi imunitasnya. Produksi senyawa antibakterial atau bersifat bakterisidal terhadap bakteri patogen dalam usus inang dan mencegah proliferasi dari bakteri patogen dalam saluran pencernaannya.

BAL yang diberikan pada ikan juga memiliki kemampuan untuk memodifikasi profil mikroorganisme dalam usus ikan dan meningkatkan kepadatan vili serta jumlah sel leukosit intraepitel. Meningkatnya kerapatan vili usus ikan akan membantu meningkatkan kapasitas penghalang terhadap invasi patogen. Kemampuan memodulasi mikrob usus ditunjukkan dengan meningkatnya populasi mikrob, dengan kata lain terjadi peningkatan konsentrasi asam laktat dalam usus ikan dan jumlah bakteri *Bacillus* sp., sehingga meningkatkan aktivitas penyerapan karena tinggi dan kepadatan mikrovili usus meningkat dan perlindungan terhadap patogen.

BAL yang diberikan dalam pakan harus mampu melekat di saluran pencernaan ikan, beradaptasi dengan asam lambung dan garam empedu, selanjutnya berperan dalam pemanfaatan nutrisi melalui peningkatan jumlah enzim pencernaan (seperti hasil uji secara *in vitro*) dan memengaruhi sistem imunitas ikan. Nilai parameter hematologis ikan (Tabel 4.2) masih berada pada kisaran yang normal. Parameter imunitas berupa jumlah sel darah putih (leukosit) maupun diferensial leukosit ikan relatif lebih tinggi dengan pemberian BAL dalam pakannya dibanding kontrol. Hal ini mengindikasikan bahwa BAL mampu meningkatkan

respons imunitas seluler ikan nila sehingga dapat menghadapi infeksi bakteri patogen, *Pseudomonas* sp.



Gambar 4.3. a. Tingkat kelangsungan hidup ikan nila (*O. niloticus*) pada akhir pengamatan, b. Jumlah bakteri *Pseudomonas* sp. dalam darah ikan nila (*O. niloticus*)

Parameter hematologi merupakan studi yang cocok untuk mendeteksi perubahan yang dipicu oleh penyakit atau status fisiologi. Jumlah eritrosit dan profil (diferensial) leukosit dapat dipengaruhi oleh faktor intrinsik atau faktor ekstrinsik seperti infeksi patogen, kontaminan air, dan pasokan imunostimulan. Pada penelitian ini terlihat bahwa perubahan parameter hematologi sebelum ujiantang dipengaruhi suplementasi BAL sebagai imunostimulan dalam pakan dan setelah ujiantang dipengaruhi bakteri *Pseudomonas* sp.

Pada penelitian yang dilakukan Li *et al.* (2020), ikan nila (*O. niloticus*) yang diberi penambahan bakteri *E. faecalis* pada konsentrasi 10^7 cfu/g menunjukkan mortalitas paling rendah dan respons imunitas terbaik selama 56 hari pemeliharaan dan diuji tantang dengan *Streptococcus agalactiae*. Usus merupakan organ imunitas yang penting bagi ikan dan sitokin berperan penting bagi imunitas saluran pencernaannya. Hal ini sejalan dengan penambahan BAL yaitu *Lp. plantarum* yang mampu meregulasi ekspresi gen IL-8 pada usus ikan trout pelangi. Kemampuan BAL dalam memengaruhi imunitas pada ikan diduga terkait dengan eksopolisakarida (EPSs) dan BAL mampu menyintesis eksopolisakarida (EPSs). Eksopolisakarida adalah suatu polisakarida hasil sekresi dari

bakteri asam laktat (BAL) yang dilepaskan pada ekstraseluler di sekitar sel. Penelitian lain yang dilaporkan oleh Tayo *et al.* (2018), menunjukkan eksopolisakarida yang diproduksi oleh *Weissella confuse* (EPSWC) memiliki potensi imunomodulator dengan merangsang produksi IgG dan IgM pada tikus. Penelitian lain yang menggunakan BAL juga memengaruhi parameter hematologi dan imunitas ikan. Suplementasi bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* meningkatkan jumlah eritrosit, kadar hemoglobin dan leukosit (Reda dan Selim, 2014).

Tabel 4.2. Kisaran Nilai Parameter Hematologis Ikan Nila (*O. niloticus*) Selama Pengamatan

| Parameter Parameters | Perlakuan Treatments | | | |
|---|-------------------------|--|--|--------------------------------------|
| | Kontrol Control | <i>E. faecalis</i> <i>E. faecalic</i> | <i>Lp. plantarum</i> <i>Lp. plantarum</i> | <i>L. lactis</i> <i>L. lactis</i> |
| Hemoglobin (g/dL) | 5,00-9,00 | 6,00-10,00 | 6,00-10,80 | 6,00-10,50 |
| Hematokrit (%) | 13,0-31,46 | 21,69-38,89 | 19,83-38,89 | 18,31-31,46 |
| Eritrosit ($\times 10^6$ sel mm^3) | 0,93-2,06 | 1,41-2,52 | 1,81-2,46 | 1,24-2,29 |
| Leukosit ($\times 10^4$ sel mm^3) | 1,14-1,98 | 1,17-2,40 | 1,39-2,38 | 1,25-2,18 |
| Limfosit (%) | 67,56-74,68 | 69,73-75,29 | 76,00-78,74 | 70,86-78,61 |
| Monosit (%) | 20,15-23,19 | 22,98-25,50 | 20,61-21,48 | 21,76-25,19 |
| Neutrofil (%) | 3,52-7,01 | 3,02-7,01 | 3,39-7,01 | 3,32-7,01 |

Suplementasi dengan *L. lactis* dapat meningkatkan kadar hematokrit ikan, begitu juga dengan *Lactobacillus* sp. selain adanya peningkatan total plasma protein yang lebih tinggi dibanding perlakuan tanpa probiotik. Kondisi ini menunjukkan dengan suplementasi probiotik ikan status kesehatan ikan menjadi lebih baik dan peningkatan plasma protein merupakan bentuk respons adaptif yang memberikan kontribusi untuk mendapatkan kembali homeostatis setelah cedera jaringan atau infeksi (Dawood *et al.*, 2016).

4.4. Pengaruh Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang terhadap Kinerja Pertumbuhan

Kinerja pertumbuhan benih ikan nila menunjukkan peningkatan dengan penambahan bakteri asam laktat dari usus ikan repang. Pada Tabel 4.3 dapat dilihat bahwa pertambahan berat (WG), laju pertumbuhan

spesifik (SGR), rata-rata pertumbuhan harian (ADG), pemanfaatan pakan berupa konversi pakan (FCR) dan efisiensi pakan (FE) ikan nila yang diberi bakteri asam laktat berbeda secara signifikan dibanding kontrol ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ketiga bakteri asam laktat dapat meningkatkan kualitas pencernaan pakan ikan, melalui peningkatan aktivitas enzim seperti yang diuji secara *in vitro*.

Kong *et al.* (2020) menemukan bahwa strain *E. faecalis* W24 (Genbank: MT102746.1), sebagai salah satu flora normal usus hewan, dan menunjukkan hasil positif berpengaruh terhadap pertumbuhan, kekebalan dan ketahanan penyakit *C. argus*. *E. faecalis* dengan dosis 10^8 cfu/g pakan selama 30 hari mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan ikan trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Banos *et al.*, 2019). Sementara pada penelitian ini *E. faecalis* juga menunjukkan kemampuan dalam meningkatkan kinerja pertumbuhan dan pemanfaatan pakan ikan nila walaupun pemberian hanya dilakukan selama 14 hari.

Bakteri *Lp. plantarum* dari usus ikan repang yang digunakan pada penelitian ini mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan dan pemanfaatan pakan ikan nila, lebih tinggi dibanding kontrol. Sementara itu pemberian *Lp. plantarum* yang berasal dari usus ikan *Pangasius* sebesar 10^8 cfu/g pakan selama delapan minggu mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan ikan nila, berupa peningkatan berat ikan, laju pertumbuhan spesifik, dan resistensi terhadap *Staphylococcus agalactiae* (van Doan *et al.*, 2019). Studi Liu *et al.*, (2021) juga menemukan bahwa suplementasi probiotik dalam diet secara signifikan mendorong pertumbuhan dan meningkatkan kekebalan bawaan pada ikan nila dibandingkan dengan kelompok non-probiotik. *E. faecalis* memiliki aktivitas enzim pencernaan terbaik dalam usus dan hati. Hal ini juga ditunjukkan pada perlakuan pemberian BAL *L. lactis*, selain mampu mendukung pertumbuhan ikan nila. *L. lactis* juga ditemukan mampu mendukung pertumbuhan, parameter imunitas dan ketahanan penyakit pada ikan sebelah (Nguyen *et al.* 2017).

Kinerja pertumbuhan dan pemanfaatan pakan ikan bisa dikaitkan dengan fungsi pencernaan usus dengan suplementasi probiotik, hal ini terkait dengan adanya peningkatan aktivitas enzim pencernaan ikan. Aktivitas enzim pencernaan berkorelasi positif dengan kapasitas pencernaan ikan sampai batas tertentu, dan meningkatkan kemampuannya

untuk mendapatkan nutrisi dari makanan. Suplementasi probiotik tunggal maupun campuran dari dua atau lebih *strain* potensial menghasilkan peningkatan pencernaan nutrisi. Organ pencernaan juga sensitif terhadap komposisi makanan dan menyebabkan perubahan langsung dalam aktivitas enzim pencernaan, yang akhirnya tercermin dalam kesehatan dan pertumbuhan ikan.

Tabel 4.3. Nilai Rata-Rata Parameter Kinerja Pertumbuhan dan Pemanfaatan Pakan Ikan Nila (*O. niloticus*)

| Parameter | Perlakuan | | | |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Kontrol | <i>E. faecalis</i> | <i>Lp. plantarum</i> | <i>L. lactis</i> |
| Berat Awal (g) | 3,33±0,07 ^a | 3,41±0,10 ^a | 3,42±0,15 ^a | 3,34±0,07 ^a |
| Berat Akhir (g) | 5,25±0,16 ^a | 7,47±0,29 ^b | 7,42±0,24 ^b | 7,12±0,29 ^b |
| WG (g) | 1,89±0,21 ^a | 4,05±0,37 ^b | 4,00±0,12 ^b | 3,78±0,26 ^b |
| SGR (%/hari) | 2,12±0,22 ^a | 3,73±0,31 ^b | 3,69±0,10 ^b | 3,61±0,16 ^b |
| ADG (g/hari) | 0,90±0,10 ^a | 1,93±0,18 ^b | 1,90±0,06 ^b | 1,80±0,12 ^b |
| FCR | 1,71±0,15 ^a | 1,33±0,09 ^b | 1,33±0,01 ^b | 1,49±0,11 ^b |
| FE (%) | 58.80±4.80 ^a | 75.36±5.50 ^b | 75.44±0.74 ^b | 67.25±4.76 ^b |

Keterangan: Huruf superskrip yang tidak sama pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata antar perlakuan pada taraf 5% ($P < 0,05$).

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa aktivitas enzimatik dari BAL dalam saluran pencernaan biota akuatik berperan penting dalam meningkatnya pemanfaatan pakan yang diberikan. Pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) pemberian pakan yang mengandung 10^7 CFU/g pakan bakteri *Lactobacillus* sp. meningkatkan beberapa enzim dalam ususnya. Pakan dengan penambahan *Lb. plantarum* 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/g mampu meningkatkan protease, amilase dan alkalin fosfatase pada lobster *Astacus leptodactylus*. Pada ikan mas (*C. carpio*), kombinasi BAL *Bacillus* sp. dengan β -glukan, manan oligosakarida mampu meningkatkan aktivitas enzim lipase, amilase, tripsin, dan protease sehingga pertumbuhan dan pemanfaatan pakannya menjadi meningkat.

Peningkatan aktivitas enzim protease pada kelompok diet suplemen probiotik diduga telah menghasilkan pencernaan protein yang lebih baik dan karenanya pertumbuhan dan kandungan protein dalam tubuh ikan menjadi lebih baik. Di lain pihak suplementasi probiotik menunjukkan

peningkatan signifikan dari total jumlah bakteri usus dan BAL, diharapkan mampu meningkatkan kesehatan dan imunitas ikan yang lebih baik begitu juga dengan pertumbuhannya. Peningkatan kolonisasi bakteri dalam saluran pencernaan ikan tergantung pada tingkat bakteri dalam diet atau pakannya.

Sebagian besar probiotik yang diberikan dalam pakan ikan menunjukkan efek melalui kolonisasi di usus inang dan ekskresi beberapa nutrisi peningkat pertumbuhan. Hal ini berarti bahwa semakin tinggi tingkat adhesi mikroorganisme yang ditambahkan melalui pakan maka akan berdampak meningkatnya pertumbuhan dan pemanfaatan nutrisi dari pakan ikan. Penambahan BAL dalam pakan ikan terbukti meningkatkan pemanfaatan protein dan lemak pada ikan air tawar dan beberapa jenis ikan air laut.

4.5. Parameter Kualitas Air pada Media Pemeliharaan Ikan

Hasil pengukuran parameter kualitas air dalam media pemeliharaan ikan nila disajikan pada Tabel 4.4. Nilai yang ada dalam tabel menunjukkan kisaran parameter kualitas air selama pengamatan. Secara umum nilai kisaran parameter kualitas air pada uji ini masih berada dalam kisaran normal untuk menunjang kehidupan ikan nila.

Tabel 4.4. Kisaran Nilai Parameter Kualitas Air pada Media Pemeliharaan Ikan

| Perlakuan | Parameter | | | |
|----------------------|-----------|---------|-------------------------|-------------------------------|
| | Suhu (°C) | pH | Oksigen terlarut (mg/L) | Total Amoniak Nitrogen (mg/L) |
| Kontrol | 26,4-28,2 | 7,2-7,6 | 4,5-5,8 | 0,11-0,29 |
| <i>E. faecalis</i> | 26,5-28,2 | 7,1-7,6 | 4,4-5,6 | 0,11-1,26 |
| <i>Lp. plantarum</i> | 26,5-28,2 | 7,1-7,5 | 4,6-5,7 | 0,11-0,21 |
| <i>L. lactis</i> | 26,6-28,0 | 7,1-7,6 | 4,4-5,7 | 0,10-0,26 |

Suhu menunjukkan kisaran 26,4-28,2 °C masih berada dalam kisaran normal, menurut Kordi (2009) suhu untuk pertumbuhan optimal ikan nila berkisar 25-30 °C. Nilai pH air berkisar 7,1-7,6 menunjukkan kisaran yang normal. Nilai pH yang cocok untuk ikan nila adalah sekitar 6-8,5 dan nilai pH yang masih bisa ditoleransi 5-11 (Kordi, 2009).

Oksigen dibutuhkan oleh sel untuk berbagai reaksi metabolisme, oleh karena itu kelangsungan hidup ikan sangat ditentukan oleh kemampuan memperoleh oksigen yang cukup dari lingkungannya. Oksigen terlarut pada uji ini menunjukkan kisaran 4,4-5,8 mg/L masih berada dalam kisaran yang normal. Menurut BSNI (2009) nilai oksigen terlarut untuk produksi ikan nila pada kolam air tenang adalah ≥ 3 mg/L. Total amoniak nitrogen berada pada kisaran 0,10-0,29 mg/L. Menurut Solichin (2012), amonia (dalam bentuk gas atau tidak terionisasi) yang terukur berkisar antara 0,03-0,18 mg/L masih berada di bawah batas maksimum. Konsentrasi amonia yang toksik dalam waktu singkat berkisar 0,6-2,0 mg/L (Pilay, 2004). Penentuan nilai total amonia nitrogen (TAN) adalah suatu metode analisis yang digunakan untuk menentukan proporsi amonia dalam bentuk terionisasi dan tidak terionisasi yang bervariasi terhadap pH dan suhu.

Hasil pengukuran nilai parameter kualitas air menunjukkan bahwa pemberian BAL dalam pakan tidak memengaruhi kualitas air dalam media pemeliharaan ikan nila. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian BAL dalam pakan selama 14 hari pada benih ikan nila menjadikan pakan yang diberikan dengan metode *at satiation* dapat direkomendasikan untuk penggunaan probiotik ini di masa yang akan datang.

V

EPILOG

Ada lima isolat bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi dari usus ikan repan (*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*. 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 resistan dan menunjukkan toleransi terhadap pH media, garam empedu, suhu dan kadar garam.

Kelima isolat bakteri asam laktat menunjukkan aktivitas enzimatis amilolitik, dan proteolitik yang lebih tinggi dibanding lipolitik. 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.

Ketiga bakteri asam laktat dari usus ikan repan ini aman digunakan sebagai kandidat probiotik dan mampu melindungi ikan nila dari infeksi bakteri *A. hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. Ketiganya juga memiliki kemampuan meningkatkan kinerja pertumbuhan dan pemanfaatan pakan pada ikan nila dengan pemberian pada dosis 0.1 mL/g pakan dengan konsentrasi 10^6 cfu/mL selama 14 hari.

Pengembangan probiotik di masa yang akan datang tidak hanya berfokus pada peningkatan ketahanan terhadap penyakit tapi juga terkait dengan performa pertumbuhan ikan. Di lain pihak 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. Pathogenecity of *Pseudomonas anguilliseptica* Infection in Goldfish (*Cyprinus Carpio*). *International Journal of Cell Science & Molecular Biology* 4(5): 111-116.
- Agustina, C. A. Pebrianto, M. Ma'ruf, A. Susanto dan M. Jannah. 2014. Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas* sp. pada Ikan yang Dibudidayakan dalam Karamba di Danau Melintang dan Sungai Mahakam Kabupaten Kutai Kartanegara Kalimantan Timur. *Prosiding Seminar Nasional Tahunan XI Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan*: 30 Agustus 2014, Yogyakarta.
- Agustina, S.B. Prayitno, A. Sabdono and G. Saptiani. 2018. Antagonistic Activity of Kelabau Fish (*Osteochilus melanopleurus*) Gut Bacteria against *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas* sp. *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-Zarzuela, 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-Zarzuela. 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.
- Banos, A., J.J. Ariza, C. Nuñez, L. Gil-Martinez, J.D. Garcia-Lopez, M. Martinez-Bueno, and E. Valdivia. 2019. Effects of *Enterococcus faecalis* UGRA10 and the enterocin AS-48 against the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. Studies in vitro and in vivo. *Food Microbiol* 77: 69-77.

- 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.
- Giri S. S., S. S. Sen, and V. Sukumaran. 2012. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunology*, 32:1135-1140.

- 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 septicaemia of catfish. *Int.J. Syst. Bacteriol.* 31: 396-400.
- Holt J. G., N. R. Krieg., P. H. A. Sneath, J. T. S. T. Stanley, William. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (ed), William Wilkins, Baltimore.
- 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. Kolangil, 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.
- Kong, Y., C. Gao, X. Du, J. Zhao, M. Lia, X. Shan, and G. Wang. 2020. Effects of single or conjoint administration of lactic acid bacteria as potential probiotics on growth, immune response and disease resistance of snakehead. *Fish Shellfish Immunol.* 102: 412-421.
- 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, Q., L. Wen, X. Pan, Y. Huang, X. Du, J. Qin, K. Zhou, Z. Wei, Z. Chen, H. Ma, T. Hu, and L. Yong. 2021. Dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis* can effectively improve the growth performance, immunity, and resistance of tilapia against *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Nutrition* 00: 1-13.
- 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.
- Mohammadian, T., M. Alishahi, M.R. Tabandeh, A.J. Nejad, E. Karami, and M. Zarea. 2018. Effects of autochthonous probiotics, isolated

- from *Tor grypus* (Karaman, 1971) intestine and *Lactobacillus casei* (PTCC 1608) on expression of immune-related genes. *Aquacult Int.* 27, 239.
- 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*). *AAFL Bioflux* 9(5): 1121-1132.
- Nath, S., V. Matozzo, D. Bhandari, and C. Faggio. 2019. Growth and liver histology of *Channa punctatus* exposed to a common biofertilizer. *Nat Prod Res.* 33: 1591-1598.
- 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. Pathogenecity of *Edwardsiella ictaluri*. [http://www.was.org/meetings/-sessionAbstract.asp? MeetingCode= WA2005 &Session =55- 24k \[11-08-2006\]](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-Zarzuola. 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. 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., H. Van Doan, S.H. Lee, M. Soltani, S.H. Hoseinifar, R. Harikrishnan, and S.K. Song. 2020. Probiotics, Lactic Acid Bacteria and Bacilli: Interesting Supplementation for Aquaculture. *J. Appl. Microbiol.* 129: 116-136.
- Ringø, E., H.S. Hossein, G. Koushik, H. Van Doan, B.B. Ram, and S.S. Kyu. 2018. Lactic acid bacteria in finfish – an update. *Front. Microbiol.* 9, 1818.
- 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., Z. Zhou, 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. *Thermosyntropho 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.
- Tayo BA, Ishola R, Oyewunmi T. 2018. Characterization, antioxidant and immunomodulatory potential on exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Weissella confusa* strains. *Biotechnology Reports* 19: 1–8.

- 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. Hlm. 99-206.
- van Doan, H., A. Kurian, S.H. Hoseinifar, M. Sel-audom, S. Jaturasitha, S. Tongsiri, and E. Ringø. 2019. Dietary inclusion of orange peels derived pectin and *Lactobacillus plantarum* for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured under indoor biofloc systems. *Aquaculture* 508: 98-105.
- 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.

UCAPAN TERIMA KASIH

Buku ini merupakan telaah dan hasil pemikiran penulis tentang *Potensi Bakteri Asam Laktat dari Usus Ikan Repang (Puntiplites waandersi) sebagai Probiotik pada Ikan*. Penyusunan buku ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan kerendahan hati dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. BOPTN Universitas Mulawarman tahun 2021 yang telah memberikan bantuan dana selama pengumpulan data pendukung buku monograf ini.
2. Dr. Ir. Komsanah Sukarti, M.P., selaku Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Mulawarman yang telah memberikan fasilitas lokasi pengamatan.
3. Para pihak terkait yang telah membantu pelaksanaan pengumpulan data sampai selesainya penulisan buku ini.

PROFIL PENULIS



Penulis dilahirkan di Muara Muntai Kabupaten Kutai Kartanegara Kalimantan Timur, pada tanggal 4 Agustus 1977.

Pendidikan sarjana ditempuh pada Program Studi Budidaya Perairan Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Mulawarman sejak tahun 1995 dan lulus tahun 1999.

Pendidikan S-2 diselesaikan di Program Studi Ilmu Perairan, Sekolah Pascasarjana IPB Bogor sejak tahun 2004 dan lulus tahun 2006. Pada tahun 2015 penulis diterima di Program Doktor Manajemen Sumberdaya Pantai Universitas Diponegoro dan menyelesaikan studi doktor pada bulan Agustus tahun 2020. Sejak tahun 2003 sampai saat ini penulis menjadi staf pengajar di Program Studi Akuakultur Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Mulawarman Samarinda.

Penulis telah mengikuti Seminar Ilmiah International Conference on Tropical Studies and Its Application pada tanggal 26-27 Agustus 2019 di Samarinda, Kalimantan Timur dan telah menghasilkan artikel ilmiah berjudul “Antagonistic activity of Kelabau fish (*Osteochilus melanopleurus*) gut bacteria against *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas* sp.” yang diterbitkan pada *Jurnal Ilmiah AACL Bioflux*, Volume 11, 2018, Issue 6, serta “Patogenicity assay of probiotic-potential bacteria from the kelabau fish (*Osteochilus melanopleurus*)” yang diterbitkan pada *Jurnal Ilmiah AACL Bioflux*, Volume 12, 2019, Issue 5.

Mengikuti seminar internasional, The 8th International Conference on Fisheries and Aquaculture (ICFA), dan mendapatkan penghargaan Session’s Best Presentation dengan presentasi berjudul “Effects of Potential Probiotic Bacteria on The Immune Response and Disease

Resistance of Kelabau Fish (*Osteochilus melanopleurus*) againsts *Pseudomonas* sp. Infection” pada 19-20 Agustus 2021. Penulis juga menyampaikan presentasi pada seminar internasional International Conference of Aquaculture Indonesia (ICAI) pada 28-30 Oktober 2021 di Semarang, dengan judul “Isolation and Identification of Potential Lactic Acid Bacteria as probiotics from the intestines of Repang Fish (*Puntiplites waandersi*)”.

Buku monograf pertama yang ditulis berjudul “Probiotik Dari Usus Ikan Kelabau: Mengatasi Infeksi Bakteri Patogen Penyebab Penyakit Bercak Merah Pada Ikan” terbit pada tahun 2022.

POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI USUS IKAN REPANG

(Puntioplites waandersi)

SEBAGAI PROBIOTIK PADA IKAN

Ada lima isolat bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi dari usus ikan repang (*Puntioplites waandersi*) yaitu dua spesies dari genus *Enterococcus*, satu spesies dari genus *Lactobacillus*, dan dua spesies dari genus *Lactococcus*. Kelima isolat bakteri asam laktat menunjukkan aktivitas antibakterial terhadap bakteri patogen *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp. dan *E. ictaluri* dalam kategori kuat.

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 secara *in vitro* maupun *in vivo* untuk dikembangkan sebagai probiotik pada ikan dengan pemberian pada dosis 0.1 mL/g pakan dengan konsentrasi 10^6 cfu/mL selama 14 hari.

Penerbit Deepublish (CV BUDI UTAMA)

Jl. Kaliurang Km 9,3 Yogyakarta 55581

Telp/Fax : (0274) 4533427

Anggota IKAPI (076/DIY/2012)

✉ cs@deepublish.co.id

📍 Penerbit Deepublish

🌐 [@penerbitbuku_deepublish](http://penerbitbuku_deepublish)

🌐 www.penerbitdeepublish.com



Kategori : Perikanan

ISBN 978-623-02-6714-7



9 786230

267147