

**ANTAGONISME BAKTERI YANG BERASAL DARI
USUS IKAN SAPU-SAPU (*Hypostomus plecostomus*)
TERHADAP BAKTERI PATOGEN**

OLEH

PUTRI MARINA KUSWARI
NPM. 164310384

SKRIPSI

*Diajukan Sebagai Syarat Untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Perikanan*



Dokumen ini adalah Arsip Miik :
Perpustakaan Universitas Islam Riau

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ISLAM RIAU
PEKANBARU
2021**

**ANTAGONISME BAKTERI YANG BERASAL DARI USUS
IKAN SAPU-SAPU (*Hypostomus plecostomus*)
TERHADAP BAKTERI PATOGEN**

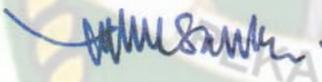
SKRIPSI

**NAMA : PUTRI MARINA KUSWARI
NPM : 164310384
PROGRAM STUDI : BUDIDAYA PERAIRAN**

**KARYA ILMIAH INI TELAH DIPERTAHANKAN DALAM UJIAN
KOMPREHENSIF YANG TELAH DILAKSANAKAN PADA TANGGAL
16 JULI 2021 DAN TELAH DISEMPURNAKAN SESUAI SARAN YANG
TELAH DISEPAKATI, KARYA ILMIAH INI MERUPAKAN SYARAT
PENYELESAIAN STUDI PADA FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ISLAM RIAU**

DISETUJUI OLEH:

DOSEN PEMBIMBING

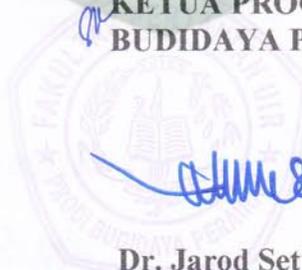

Dr. Jarod Setiaji, S.Pi, M.Sc
NIDN: 1016066802

**DEKAN FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ISLAM RIAU**

**KETUA PROGRAM STUDI
BUDIDAYA PERAIRAN**



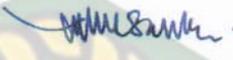
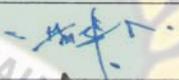
Dr. Ir. Hj. Siti Zahrah, MP
NIDN: 0013086004



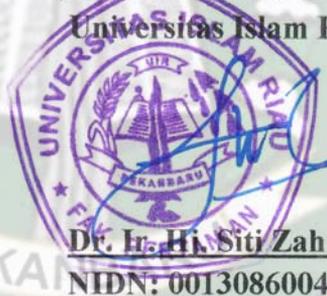
Dr. Jarod Setiaji, S.Pi, M.Sc
NIDN: 1016066802

**KARYA ILMIAH INI TELAH DIPERTAHANKAN DALAM
UJIAN KOMPREHENSIF PROGRAM STUDI BUDIDAYA
PERAIRAN FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ISLAM RIAU**

TANGGAL, 16 JULI 2021

No.	Nama	Jabatan	Tanda Tangan
1	Dr. Jarod Setiaji, S.Pi., M.Sc	Ketua	
2	Ir. T. Iskandar Johan, M.Si	Anggota	
3	Muhammad Hasby, S.Pi., M.Si	Anggota	
4	Hisra Melati, S.Pi., M.Si	Notulen	

Mengetahui
Dekan Fakultas Pertanian
Universitas Islam Riau



Dr. Ir. Hj. Siti Zahrah, MP
NIDN: 0013086004

BIOGRAFI PENULIS



Putri Marina Kuswari adalah nama penulis skripsi ini. Lahir pada tanggal 17 Desember 1997 di Malang, Jawa Timur. Penulis adalah anak pertama dari 2 bersaudara dari pasangan Samulyono dan Neneng Maryuti. Penulis pertama kali masuk SD Negeri 070 Kayu Aro pada tahun 2005 dan tamat tahun 2011, pada tahun yang sama, penulis melanjutkan pendidikan ke SMP Negeri 1 Kampar dan tamat pada tahun 2013. Setelah tamat SMP penulis melanjutkan pendidikan ke SUPM Negeri Pariaman dan tamat pada tahun 2016. Pada tahun 2016, penulis terdaftar sebagai mahasiswi di Universitas Islam Riau, Fakultas Pertanian jurusan Budidaya Perairan. Dengan izin Allah SWT pada tanggal 16 Juli 2021 penulis menyelesaikan pendidikan Strata-1 (S1) dengan judul skripsi "**Antagonisme Bakteri yang Berasal dari Usus Ikan Sapu-sapu (*Hypostomus plecostomus*) Terhadap Bakteri Patogen**".

Putri Marina Kuswari, S.Pi

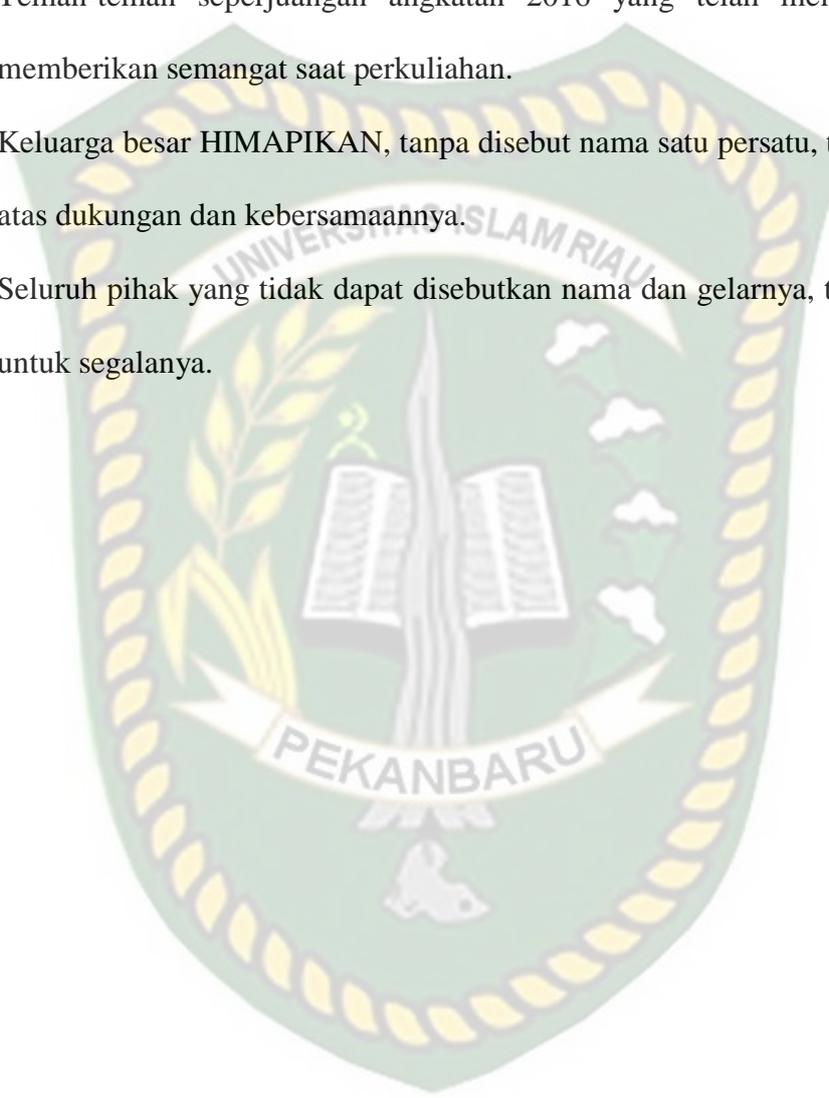
UCAPAN TERIMA KASIH

Skripsi ini penulis persembahkan untuk kedua orang tua, keluarga besar dan seluruh pihak yang selalu menanyakan kapan wisuda. Selama menyelesaikan skripsi ini, penulis telah mendapat banyak bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, secara langsung maupun tidak langsung, baik moril maupun materil. Untuk itu dengan segala kerendahan hati, penulis ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Allah SWT yang selalu memberikan berkah, rahmat dan nikmatnya pada setiap langkah penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Kedua orang tua tercinta, ayah Samulyono dan ibu Neneng Maryuti yang selalu mendoakan dan memberikan dukungan teramat tulus demi kesuksesan anak-anaknya.
3. Adik tersayang, Putri Kumala Dewi serta seluruh keluarga besar yang selalu mendukung, memotivasi dan memberi nasihat pada penulis.
4. Bapak Prof. Dr. H. Syafrinaldi, S.H, M.CL selaku Rektor Universitas Islam Riau.
5. Ibu Dr. Ir. Hj. Siti Zahrah, MP selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau.
6. Bapak Dr. Jarod Setiaji, S.Pi, M.Sc selaku Ketua Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau, sekaligus dosen pembimbing yang telah banyak memberikan bantuan dan arahan serta motivasi kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.
7. Ibu Hj. Sri Ayu Kurniati, SP, M.Si selaku Sekretaris Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau.

8. Bapak Ir. Fakhrunnas MA Jabbar, M.I.Kom selaku dosen PA yang telah mendukung penulis untuk menyelesaikan kuliah dengan cepat.
9. Bapak Ir. T. Iskandar Johan, M.Si selaku Ketua Balai Benih Ikan (BBI) Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau.
10. Bapak Prof. Dr. Muchtar Achmad, M.Sc, bapak Muhammad Hasby, S.Pi, M.Si, bapak Dr. Ir. H. Agusnimar, M.Sc, bapak Ir. H. Rosyadi, M.Si selaku dosen Program Studi perikanan Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau.
11. Ibu Hisra Melati, S.Pi, M.Si dan bapak Valentio F.P, S.Si selaku staf laboratorium Balai Benih Ikan Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau yang telah banyak memberikan bantuan, dukungan dan masukan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
12. Apriansyah, Ahmed Bahri, S.Pi, Rahmat Huluan, Supriadi, Mike Oktaria D dan Nurul Fauziana sebagai rekan dalam pelaksanaan penelitian yang banyak membantu dan memberi semangat.
13. Member Bangtan Sonyeondan (BTS) Kim Namjoon, Kim Seokjin, Min Yoongi, Jung Hoseok, Park Jimin, Kim Taehyung dan Jeon Jungkook yang telah menyemangati dan memotivasi penulis melalui karya-karyanya, lewat lagu-lagu terbaik yang selalu menemani penulis selama pengerjaan dan penyusunan skripsi ini.
14. Sahabatku, Marlaily Idris, S.T, Harni Sri Mulyani, S.Pi, Suci Noviarti, Dinda Rahayu, Safitriani Latif, S.Pi, M.Si dan Yunita Rusdiana, S.Pi yang selalu membantu dan menyemangati penulis untuk cepat menyelesaikan kuliah.

15. Latifah Salsabilla, Irma Nopia, Nurul Nurlatifah, Kris Monika I dan keluarga virtualku, ARMY yang selalu memberi semangat dan mau mendengarkan keluh kesah penulis.
16. Teman-teman seperjuangan angkatan 2016 yang telah membantu dan memberikan semangat saat perkuliahan.
17. Keluarga besar HIMAPIKAN, tanpa disebut nama satu persatu, terima kasih atas dukungan dan kebersamaannya.
18. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan nama dan gelarnya, terima kasih untuk segalanya.



ABSTRAK

PUTRI MARINA KUSWARI (164310384) “ANTAGONISME BAKTERI YANG BERASAL DARI USUS IKAN SAPU-SAPU (*Hypostomus plecostomus*) TERHADAP BAKTERI PATOGEN” dibawah bimbingan bapak Dr. Jarod Setiaji, S.Pi, M.Sc. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus sampai September 2020 di laboratorium Mikrobiologi Balai Benih Ikan (BBI) Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau Pekanbaru. Uji PCR dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Universitas Riau dan analisis sekuensing dilakukan di PT. Genetika Science Indonesia Jakarta Barat. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui daya hambat bakteri dari usus ikan sapu-sapu (*Hypostomus plecostomus*) terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Vibrio alginolyticus*. Metode penelitian yang digunakan, yaitu metode eksploratif. Hasil penelitian diperoleh 5 isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu. Daya hambat pada uji antagonis, isolat bakteri B4 terhadap pertumbuhan ketiga bakteri patogen tergolong kuat. Isolat bakteri B3 tergolong kuat terhadap pertumbuhan bakteri patogen *A. hydrophila* dan *P. aeruginosa* dan tergolong sedang terhadap pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*. Isolat bakteri B1 tergolong kuat terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* dan tergolong sedang terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Isolat bakteri B2 terhadap pertumbuhan ketiga bakteri patogen tergolong sedang. Isolat bakteri B5 tergolong kuat terhadap pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* dan tergolong sedang terhadap bakteri *P. aeruginosa* dan *A. hydrophila*. Hasil penelusuran sistem BLAST, isolat B1 memiliki kemiripan DNA dengan *Bacillus paramycoides*. Isolat B3 dengan *Bacillus* sp. dan isolat B4 dengan *Bacillus megaterium*.

Kata Kunci: Ikan sapu-sapu (*Hypostomus plecostomus*), uji antagonis, antibakteri, *Bacillus paramycoides*, *Bacillus* sp, *Bacillus megaterium*.

ABSTRACT

PUTRI MARINA KUSWARI (164310384) "ANTAGONISM OF BACTERIA COMING FROM THE INTELLIGENCE OF BROKE FISH (*Hypostomus plecostomus*) AGAINST PATHOGENIC BACTERIA" Under the guidance of Mr. Dr. Jarod Setiaji, S.Pi, M.Sc. This research was carried out from August to September 2020 at the Microbiology Laboratory of the Fish Seed Center (BBI) Faculty of Agriculture, Riau Islamic University, Pekanbaru. The PCR test was carried out at the Molecular Biology Laboratory, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Riau University and the sequencing analysis was carried out at PT. Genetics Science Indonesia, West Jakarta. The purpose of this study was to determine the inhibition of bacteria from the intestines of broomfish (*Hypostomus plecostomus*) against the growth of pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio alginolyticus*. The research method used is the exploratory method. The results obtained 5 bacterial isolates from the intestines of broomfish. The inhibitory power in the antagonist test, B4 bacterial isolates against the growth of the three pathogenic bacteria was quite strong. B3 bacterial isolates were classified as strong against the growth of pathogenic bacteria *A. hydrophila* and *P. aeruginosa* and moderately against the growth of *V. alginolyticus* bacteria. Bacterial isolate B1 was classified as strong against the growth of *P. aeruginosa* and *V. alginolyticus* bacteria and moderately against the growth of *A. hydrophila* bacteria. Isolation of B2 bacteria against the growth of the three pathogenic bacteria was classified as moderate. Bacterial isolate B5 was classified as strong against the growth of *V. alginolyticus* and moderate against *P. aeruginosa* and *A. hydrophila* bacteria. The results of the BLAST system search, isolate B1 had similar DNA with *Bacillus paramycoides*. Isolate B3 with *Bacillus* sp. and isolate B4 with *Bacillus megaterium*.

Keywords: Broomfish (*Hipostomus plecostomus*), antagonist test, antibacterial, *Bacillus paramycoides*, *Bacillus* sp, *Bacillus megaterium*.

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan kehadiran Allah SWT karena berkat rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Antagonisme Bakteri yang berasal dari Usus Ikan Sapu-sapu (*Hipostomus plecostomus*) Terhadap Bakteri Patogen”.

Skripsi ini diajukan sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Jurusan Perikanan Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau. Tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dr. Jarod Setiaji, S.Pi, M.Sc selaku Dosen Pembimbing yang telah memberikan arahan dan bimbingan sehingga skripsi ini dapat disusun dan diselesaikan dengan baik, selanjutnya kepada rekan-rekan yang telah memberikan dukungan dan semangat kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini terdapat banyak kekurangan baik dari segi penyusunan, bahasa serta materi yang terdapat didalamnya. Oleh karena itu penulis menerima kritikan yang sifatnya membangun demi kesempurnaan skripsi ini, semoga skripsi ini bermanfaat bagi kita semua.

Pekanbaru, Juli 2021

Penulis

DAFTAR ISI

Isi	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	
BIOGRAFI PENULIS	
UCAPAN TERIMA KASIH	
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Batasan Masalah	4
1.4. Tujuan dan Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Biologi dan Ekologi Ikan Sapu-sapu (<i>H. plecostomus</i>).....	5
2.2. Bakteri di Usus Ikan	8
2.3. Pertumbuhan Bakteri	9
2.4. Bakteri Patogen.....	11
2.4.1. <i>Aeromonas hydrophila</i>	12
2.4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.4.3. <i>Vibrio alginolyticus</i>	16
2.5. Uji Antagonis	17
2.6. Identifikasi Bakteri	20
III. METODE PENELITIAN	
3.1. Waktu dan Tempat.....	22
3.2. Alat dan Bahan	22
3.2.1. Alat Penelitian	22
3.2.2. Bahan Penelitian	23
3.3. Metode Penelitian	24
3.4. Prosedur Penelitian	24
3.4.1. Pengambilan Ikan Sapu-sapu (<i>H. plecostomus</i>).....	25
3.4.2. Sterilisasi Alat dan Aquades	25

3.4.3. Pembuatan Media Nutrien Agar (NA)	26
3.4.4. Pengenceran Sampel Isolat dari Usus Ikan Sapu-sapu (<i>H. plecostomus</i>)	27
3.4.5. Penanaman Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu pada Media Nutrien Agar (NA)	28
3.4.6. Peremajaan Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu (<i>H. plecostomus</i>)	28
3.4.7. Peremajaan Bakteri Patogen	29
3.4.8. Penanaman Bakteri Patogen pada Media Nutrien Agar (NA)	29
3.4.9. Peremajaan Bakteri dan Patogen pada Media Nutrien Broth (NB)	30
3.4.10. Uji Antagonis	30
3.4.11. Identifikasi Bakteri	32
3.4.12. Uji PCR (Polimerase Chain Reaction).....	32
3.4.13. Elektroforesis DNA	33
3.5. Parameter Penelitian	34
3.6. Hipotesis dan Asumsi	34
3.7. Analisis Data	35
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1. Uji Antagonis	36
4.2. Analisis Sekuen dan Blast DNA Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu	41
V. KESIMPULAN DAN SARAN	47
5.1. Kesimpulan	47
5.2. Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN	55

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1. Alat Penelitian	22
3.2. Bahan Penelitian	23
3.3. Komponen PCR untuk Amplifikasi DNA Bakteri	33
4.1. Rata-rata Diameter Zona Hambat Uji Antagonis Terhadap Pertumbuhan Bakteri Patogen (mm)	36
4.2. Penelusuran Sekuen 16S rDNA Isolat Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu dengan Sistem Blast	42



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Sapu-sapu (<i>H. plecostomus</i>).....	5
2. Fase Pertumbuhan Bakteri	11
3. <i>Aeromonas hydrophila</i>	13
4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
5. <i>Vibrio alginolyticus</i>	17
6. Zona Bening pada Uji Antagonis	19
7. Pewarnaan Gram pada Bakteri	21
8. Rancangan Penelitian	24
9. Skema Prosedur Penelitian	25
10. Hasil Zona Hambat Uji Antagonis Bakteri B-4 pada Bakteri Patogen...	38
11. Rata-rata Diameter Zona Hambat Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu pada Uji Antagonis	38
12. Hasil Elektroforesis DNA Isolat Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Lokasi Penelitian	56
2. Bahan Penelitian	57
3. Alat Penelitian	58
4. Pelaksanaan Penelitian	59
5. Uji Antagonis Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu Terhadap Pertumbuhan Bakteri Patogen	61
6. Urutan Basa Nitrogen Sekuen DNA Isolat Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu	62
7. Isolat Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu Terdaftar di <i>Genbank</i>	64
8. Hasil Zona Hambat Uji Antagonis	65

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mikroorganisme atau mikroba adalah organisme yang sangat kecil sehingga untuk mengamatinya memerlukan bantuan mikroskop, mikroorganisme juga disebut organisme mikroskopis, mikroorganisme sering kali bersel tunggal (uniseluler) atau multiseluler. Peran mikroorganisme sangat luas salah satunya dalam bidang budidaya perairan, komponen ekosistem perairan dikelompokkan menjadi dua, yaitu komponen biotik yang meliputi ikan yang dibudidayakan, organisme renik (mikroorganisme), vegetasi perairan dan hewan tingkat tinggi lainnya; serta komponen abiotik yang meliputi parameter fisika-kimia air, substrat dasar kolam, iklim (Zonneveld *et al.*, 1991 dalam Odum, 1993).

Mikroorganisme berdasarkan sifat dan ukurannya dikategorikan dalam empat kelompok yaitu virus, bakteri, jamur dan alga (Achmadi, 2006). Menurut Madigan *et al.*, (2006) bakteri adalah organisme yang tidak memiliki membran inti sel dan ukurannya sangat kecil (mikroskopik). Beberapa kelompok bakteri dapat memberikan manfaat maupun sumber penyakit, salah satu bakteri yang memberikan manfaat adalah bakteri probiotik yang ada dalam saluran pencernaan.

Probiotik merupakan makanan tambahan berupa sel-sel mikroba hidup, yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi inang yang mengkonsumsinya melalui penyeimbangan flora mikroba intestinalnya (Fuller 1987). Selanjutnya Verschere *et al.*, (2000) menyatakan bahwa probiotik sebagai penambah mikroba hidup yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi komunitas mikroba di lingkungan hidupnya. Pendapat lain oleh Salminen *et al.*, (1999) bahwa probiotik

merupakan segala bentuk preparasi sel mikroba atau komponen sel mikroba yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi kesehatan dan kehidupan inang.

Bakteri probiotik sangat menguntungkan bagi pencernaan ikan, bakteri probiotik ini dapat meningkatkan daya cerna dalam tubuh ikan yang berguna untuk meningkatkan efisiensi pakan. Peranan lain yang dimiliki yaitu mengontrol bakteri yang tidak diinginkan seperti bakteri patogen yang dapat mengganggu bahkan menjadi sumber penyakit dan dapat menyebabkan kematian massal pada sejumlah besar populasi ikan (Zulkifli, 2001).

Prinsip dasar kerja probiotik adalah pemanfaatan kemampuan mikroba dalam meningkatkan penyerapan senyawa-senyawa racun pada saluran pencernaan ikan yang dihasilkan pada metabolisme bakteri probiotik seperti asam laktat, hidrogen peroksida, bakteriosin (Yulvizar *et al.*, 2014). Probiotik tidak hanya menjaga keseimbangan ekosistem dalam saluran pencernaan namun juga dapat menahan aktifitas mikroba pengurai protein sehingga menyebabkan kadar amonia feses menurun. Suplementasi probiotik dapat memperbaiki fungsi dan kesehatan usus serta meningkatkan *uptake nutrient* (Manin *et al.*, 2012).

Ikan sapu-sapu (*H. plecostomus*) merupakan jenis ikan yang banyak ditemukan di perairan sungai yang mampu bertahan pada perairan tercemar. Keberadaan ikan ini erat kaitannya dengan kemampuannya untuk bertahan hidup pada area perairan yang tercemar dan mengalami deoksigenasi (Kottelat *et al.*, 1993). Meskipun demikian, gangguan fisiologis ikan sapu-sapu yang hidup di perairan tercemar tersebut bisa saja terjadi misalnya pada perilaku atau aktifitas respirasinya (Fadil *et al.*, 2011).

Populasi ikan sapu-sapu di sungai yang airnya sudah tercemar cukup tinggi dibandingkan dengan jenis ikan lain. Hal ini dikarenakan ikan sapu-sapu lebih tahan terhadap kondisi air yang ekstrim dibanding jenis ikan lain. Ikan sapu-sapu dapat hidup di perairan dengan kadar oksigen terlarut yang rendah dan kandungan logam berat yang tinggi, dimana hanya sedikit spesies ikan yang dapat hidup di perairan tersebut (Prihardhyanto *dalam* Surnesih, 2000).

Beberapa jenis bakteri yang terdapat dalam saluran pencernaan hewan memiliki peran penting dalam rangka meningkatkan pemanfaatan pakan, kesehatan ikan dan perbaikan mutu lingkungan dan mikroorganismenya (Watson *et al.*, 2008). Selain itu, beberapa bakteri baik (probiotik) pada saluran pencernaan ikan sapu-sapu memiliki peran yang cukup penting untuk menghasilkan beberapa jenis enzim dalam saluran pencernaan ikan sapu-sapu yang turut berperan dalam metabolisme dan ketahanan tubuh terhadap patogen.

Berdasarkan beberapa uraian di atas, penulis tertarik untuk melakukan penelitian tentang: “Antagonisme Bakteri yang Berasal dari Usus Ikan Sapu-sapu (*Hypostomus plecostomus*) Terhadap Bakteri Patogen”.

1.2 Rumusan Masalah

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan:

Apakah ada bakteri yang bersifat antagonis dari usus ikan sapu-sapu (*Hypostomus plecostomus*) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Vibrio alginolyticus*.

1.3 Batasan Masalah

Dalam penelitian ini diperlukan batasan masalah agar terarah dan tidak menyimpang dari maksud dan tujuan yang telah ditetapkan. Batasan masalah dan ruang lingkup penelitian ini yaitu hanya membahas tentang bakteri yang bersifat antagonis dari usus ikan sapu-sapu (*Hypostomus plecostomus*) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Vibrio alginolyticus*.

1.4 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui daya hambat bakteri dari usus ikan sapu-sapu (*Hypostomus plecostomus*) terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Vibrio alginolyticus*.

Sedangkan manfaat yang didapat dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi mengenai bakteri yang bersifat antagonis yang berasal dari usus ikan sapu-sapu (*Hypostomus plecostomus*) terhadap bakteri patogen.
2. Diperoleh jenis bakteri yang berperan sebagai kandidat probiotik.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biologi dan Ekologi Ikan Sapu-sapu (*H. plecostomus*)

Menurut Kotellat *et al.*, (1993) ikan sapu-sapu diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Actinopterygii
Ordo	: Siluriformes
Famili	: Loricariidae
Genus	: Hypostomus
Spesies	: <i>Hypostomus plecostomus</i>



Gambar 1. Ikan Sapu-sapu (*H. plecostomus*) (Sumber: transkepri.com)

Ikan sapu-sapu merupakan ikan yang termasuk kelompok *invasive species*. *Invasive species* adalah spesies yang dapat menjadi predator maupun kompetitor terhadap spesies lain (Hill dan Lodge, 1999). Selain itu ikan ini dapat menyebabkan hibridisasi yang tidak terduga (Mallet, 2007). Nico *et al.*, (2012) mengatakan bahwa keberadaan ikan sapu-sapu dapat diketahui dari adanya lubang-lubang yang terlihat di sepanjang lereng atau pinggir sungai dan berfungsi sebagai tempat peletakkan telur ikan.

Secara umum anggota dari marga *Pterygoplichthys* sangat mudah untuk dibedakan dengan spesies lainnya. Tubuh sapu-sapu tertutup oleh kulit keras yang berbentuk seperti lempengan tulang (*bony plate*). Bentuk kepala ikan sapu-sapu lebar, membulat dan mempunyai pola geometris (Kusonoki *et al.*, 2007). Mulut berbentuk seperti cakram yang letaknya di bagian bawah sejajar dengan perut. Sirip punggung dengan 9 sampai 14 jari-jari, panjang maksimal mencapai 70 cm dan bobot mencapai 310 gram (Elfidasari *et al.*, 2016). Nico dan Martin (2001) menambahkan bahwa sapu-sapu dapat mencapai ukuran sampai 35 cm dalam waktu dua tahun. Untuk ukuran matang gonad ikan sapu-sapu pertama kali pada kisaran ukuran 25 cm (Nico *et al.*, 2012).

Ikan sapu-sapu secara morfologi memiliki tubuh yang ditutupi dengan sisik yang keras yang fleksibel, memiliki bentuk picak atau depressed (Bhagawati *et al.*, 2013). Bagian perut ikan sapu-sapu memiliki pola titik-titik putih besar dengan beberapa pola menyatu, pola ini berbeda tiap spesiesnya dan dilengkapi dengan mulut penghisap pada bagian bawah (Hoover *et al.*, 2004). Menurut Kusonoki *et al.*, (2007) beberapa spesies ikan sapu-sapu memiliki pola seperti macan tutul yaitu dengan bintik-bintik.

Ikan sapu-sapu memiliki mata berukuran kecil dan cenderung menonjol, pada bagian pipi dan sisi tubuh terdapat suatu pola yang menyerupai gelombang laut berbentuk tegak, warna tubuh ikan ini bervariasi mulai dari keabu-abuan, coklat kekuningan sampai kehitaman.

Habitat asli ikan sapu-sapu adalah perairan sungai dengan aliran air relatif deras dan jernih, tetapi juga dapat hidup diperairan tergenang seperti rawa dan danau. Ikan sapu-sapu dapat hidup diperairan dengan kadar oksigen terlarut yang

rendah, dimana hanya sedikit spesies lain yang dapat bertahan hidup diperairan tersebut (Prihardhyanto, 1995).

Ikan sapu-sapu mendiami perairan tenang sampai deras dan dapat dijumpai hampir di seluruh perairan tawar seperti sungai, anak sungai, danau, kolam, parit, sawah, rawa-rawa bahkan di perairan payau. Selain itu seperti telah dijelaskan bahwa ikan sapu-sapu bebas hidup dan berkembang di perairan yang tercemar logam berat sekalipun.

Ikan sapu-sapu dapat hidup secara optimal di perairan tropis dengan kisaran pH 7-7,5 dan suhu antara 23-28 °C. Walaupun demikian, ikan ini dapat hidup dengan baik pada kondisi perairan yang kurang baik sehingga dapat berperan sebagai bioindikator lingkungan (Page dan Robins, 2006). Kemudian Prihardhyanto *dalam* Sutanti (2005) mengatakan bahwa ikan sapu-sapu biasa mengkonsumsi alga yang melekat pada bebatuan, tumbuhan air dan detritus. Sapu-sapu juga mengkonsumsi bangkai ikan dan hewan-hewan lain yang ada di dasar perairan sehingga ikan sapu-sapu digolongkan ke dalam kelompok omnivora.

Menurut Ozedilek (2007) makanan ikan sapu-sapu adalah alga, ganggang benthik, detritus, cacing dan beberapa jenis larva serangga yang ada di perairan. Chaicana dan Jongphadungkiet (2012) menyatakan bahwa sapu-sapu juga memangsa ikan-ikan kecil dan telur ikan. Panase dan Intawicha (2018) menambahkan bahwa sapu-sapu memakan tumbuhan dan fitoplankton di dasar perairan dengan cara mengikis atau menyedot secara halus.

Menurut Hart *dalam* Wiyaguna (2010) salah satu jenis ikan yang mampu hidup di perairan tercemar adalah ikan sapu-sapu. Ikan ini mempunyai

kelimpahan yang tinggi pada sungai-sungai dengan kadar pH 6,2-8,3 dan pada sungai-sungai yang tercemar logam berat seperti tembaga (Cu), Kadmium (Cd), dan Timbal (Pb). Selain itu Riyanto (2006) menyebutkan bahwa terdapat ikan sapu-sapu yang hidup di perairan daerah Sragen yang kualitasnya tergolong buruk, yaitu dengan kandungan oksigen 0-6 mg/l, karbondioksida tinggi (9,54-34,32 mg/l), amonia hingga 21,67 mg/l, COD hingga 172 mg/l dan lemak hingga 54,6 mg/l.

2.2. Bakteri di Usus Ikan

Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme yang mampu untuk memodifikasi komposisi bakteri dalam saluran pencernaan, air dan sedimen serta dapat digunakan sebagai biokontrol. Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang apabila terdapat dalam jumlah yang cukup, ini akan bermanfaat untuk meningkatkan kesehatan inang khususnya pada saluran pencernaan. Peningkatan kesehatan inang melalui probiotik dapat dicapai dengan salah satu atau beberapa mekanisme berikut: kompetisi dengan bakteri patogen, peningkatan penyerapan nutrisi dalam pakan, perombakan bahan organik dalam air juga peningkatan respon imun terhadap patogen (Reneshwary *et al.*, 2011).

Probiotik adalah mikroorganisme yang hidup dengan cara memperbaiki keseimbangan mikroba pada usus dan sebagai penyiapan sel mikroba atau komponen sel mikroba yang memiliki pengaruh menguntungkan pada kesehatan inangnya (Sornplang dan Sudthidol, 2016). Pendapat lain mengatakan bahwa probiotik adalah mikroba hidup yang bersifat menguntungkan bagi makhluk hidup dan mampu memperbaiki keseimbangan mikroba dalam saluran pencernaan (Afriyanto dan Liviawati, 2005)

Irianto (2003) mengatakan bahwa probiotik dapat mengatur lingkungan mikroba pada usus serta menghalangi mikroorganisme patogen dalam usus dengan melepas enzim yang membantu proses pencernaan makanan. Selain itu mikroba probiotik aman dan relatif menguntungkan dalam saluran pencernaan sebab menghasilkan zat yang tidak berbahaya bagi ikan tetapi justru menghancurkan mikroba patogen pengganggu pada sistem pencernaan.

2.3. Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan merupakan proses bertambahnya ukuran, substansi atau masa zat dari suatu organisme, misalnya makhluk makro dikatakan tumbuh ketika bertambah tinggi, bertambah besar atau bertambah berat. Sedangkan pada organisme bersel satu pertumbuhan lebih diartikan sebagai penambahan jumlah koloni, ukuran koloni yang semakin besar, substansi atau massa mikroba dalam koloni tersebut semakin banyak (Anonim, 2010).

Pertumbuhan pada mikroba diartikan juga sebagai penambahan jumlah sel mikroba itu sendiri. Pertumbuhan merupakan suatu proses kehidupan yang *irreversible* atau tidak dapat diulang kejadiannya. Sebagai hasil penambahan ukuran dan pembelahan sel atau penambahan jumlah sel maka terjadi pertumbuhan populasi mikroba (Iqbalali, 2008).

Kehidupan dan kegiatan makhluk hidup dipengaruhi oleh faktor-faktor pertumbuhan begitupun mikroorganisme seperti bakteri. Pertumbuhan bakteri pada umumnya sangat dipengaruhi oleh nutrisi, suhu, pH, air dan oksigen. Perubahan faktor-faktor ini dapat mengakibatkan perubahan sifat dan bentuk secara morfologi serta cara kerja secara fisiologi. Salah satu faktor utama yang

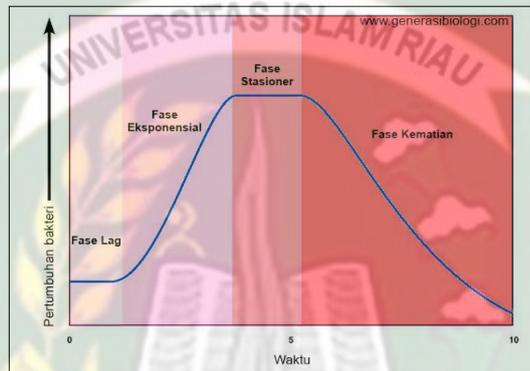
mempengaruhi pertumbuhan bakteri tersebut adalah suhu (Pelczar dan Chan, 2005).

Suhu merupakan satu faktor yang sangat penting dalam mempengaruhi pertumbuhan dan daya hidup bakteri. Suhu berpengaruh pada reaksi kimia yang terjadi di dalam tubuh bakteri sehingga tingkat pertumbuhannya juga ikut terpengaruhi. Selain suhu, pH juga mempengaruhi pertumbuhan bakteri (Pelczar dan Chan, 2005).

pH umum yang disukai oleh mikroba adalah netral atau pH 7. Beberapa bakteri juga tumbuh pada pH 6, bahkan ada juga dijumpai mikroba yang mampu tumbuh pada pH 4 atau pH 5. Sangat jarang suatu mikroba tumbuh baik pada pH 4, kecuali bakteri autotrof tertentu karena bakteri ini menghasilkan produk metabolisme yang bersifat asam atau basa (Volk dan Wheeler, 1993).

Mikroorganisme dapat ditumbuhkan dan dikembangkan pada substrat yang disebut medium. Untuk mengembangbiakkan mikroorganisme diperlukan media. Media adalah substansi yang terdiri dari beberapa campuran seperti zat-zat makanan (nutrisi) yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan jasad renik (mikroorganisme). Media dapat berbentuk padat, cair dan semi padat (*semi solid*) tergantung jenisnya. Dalam laboratorium mikrobiologi, kultur media sangat penting untuk isolasi, pengujian sifat-sifat fisik dan biokimia bakteri serta untuk mendiagnosa suatu penyakit (Hidayat dan Sutarma, 1999). Menurut Dwidjoseputro (1987) makanan yang paling baik untuk pertumbuhan bakteri adalah media yang mengandung zat-zat organik seperti rebusan daging, sayur-sayuran, sisa makanan atau campuran-campuran yang dibuat oleh manusia.

Fase pertumbuhan bakteri dapat dipisahkan menjadi empat fase utama yaitu fase lag (fase lamban), fase pertumbuhan eksponensial (fase pertumbuhan cepat), fase stasioner (fase stasis), dan fase penurunan populasi (fase pematian). Fase-fase tersebut menunjukkan keadaan bakteri dalam biakan pada waktu tertentu. Pada setiap fase terdapat suatu periode peralihan dimana waktu dapat berlalu sebelum semua sel memasuki fase yang baru (Kusnadi, 2003).



Gambar2. Fase Pertumbuhan Bakteri (Sumber: generasibiologi.com)

2.4. Bakteri Patogen

Patogen adalah agen biologis yang dapat menyebabkan penyakit, patogen juga sering disebut parasit dan bersifat merugikan, mengacaukan fisiologis normal pada makhluk hidup lain. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri pada ikan merupakan salah satu penyakit yang dapat menimbulkan kerugian. Selain dapat mematikan ikan, penyakit ini juga dapat mengakibatkan menurunnya kualitas daging ikan yang terinfeksi serta dapat menyebabkan sistemik yang menimbulkan kematian ikan yang tinggi (Lukistyowati dan Kurniasih, 2012).

Bakteri patogen pada ikan dapat bersifat sebagai penginfeksi primer atau sekunder. Di Indonesia penyakit akibat infeksi bakteri dapat mengakibatkan kematian sekitar 50-100% (Wiyanto, 2010). Menurut Kismiyati *et al.*, (2009)

faktor yang menyebabkan timbulnya penyakit yaitu disebabkan oleh mikroorganisme seperti bakteri, jamur dan virus. Sementara faktor yang dapat mempengaruhi yaitu kualitas air yang buruk, pakan dan kandungan oksigen terlarut yang rendah.

2.4.1. *Aeromonas hydrophila*

Salah satu bakteri yang sering dijumpai pada ekosistem perairan yaitu bakteri *A. hydrophila*. *A. hydrophila* bersifat patogen pada ikan air tawar dan ikan budidaya pada kondisi kualitas air yang buruk. Selain itu *A. hydrophila* memiliki kemampuan osmoregulasi yang tinggi sehingga mampu bertahan hidup pada perairan tawar, perairan payau dan laut yang memiliki kadar garam tinggi dengan penyebaran melalui air, kotoran burung, saluran pencernaan hewan darat dan hewan amfibi serta reptil (Mangunwardoyo *et al.*, 2010).

Klasifikasi bakteri *A. hydrophila* menurut Holt *et al.*, (2000) yaitu:

Filum	: Protophyta
Kelas	: Schyzomycetes
Ordo	: Pseudomonadales
Family	: Vibrionaceae
Genus	: Aeromonas
Spesies	: <i>Aeromonas hydrophila</i>

A. hydrophila merupakan bakteri heterotrofik uniseluler, tergolong protista prokariot yang dicirikan tidak memiliki membran yang memisahkan inti dengan sitoplasma. Bakteri ini biasanya berukuran 0,7-1,8 x 1,0-1,5 µl yang bergerak menggunakan sebuah polar flagel (Kabata dalam Haryani, *et al.*, 2012).

Bakteri *A. hydrophila* termasuk dalam bakteri gram negatif yang mempunyai karakteristik berbentuk batang pendek, bersifat aerob dan fakultatif anaerob, tidak berspora, motil, mempunyai satu flagel dan hidup pada kisaran suhu 25-30°C. Jika organisme terkena serangan bakteri maka akan mengakibatkan gejala penyakit *hemorhagi septicaemia* yang mempunyai gejala seperti terdapat luka di permukaan tubuh, insang, ulser, abses dan perut gembung (Lukistyowati dan Kurniasih, 2012).

Bakteri *A. hydrophila* termasuk bakteri gram negatif, yang bersifat oksidasi positif dan dapat memfermentasi beberapa jenis gula, seperti glukosa, fruktosa, maltosa dan trehalosa (Rosidah dan Wila, 2012). Bakteri gram negatif mempunyai lapisan peptidoglikan yang tipis, terdiri atas 1-2 lapis sehingga pori-pori pada dinding sel gram negatif cukup besar. Permeabilitasnya yang tinggi memungkinkan terjadi perlepasan kompleks ungu kristal-yodium (UK-Y), sehingga bakteri berwarna merah. Dalam proses pewarnaan gram, pencucian dengan alkohol akan menyebabkan lemak tersebut terekstraksi sehingga bakteri berwarna merah atau merah muda karena menyerap zat warna safranin (Firnanda, *et al.*, 2013).



Gambar 3. *Aeromonas hydrophila* (Sumber: creative-biolabs.com)

Penyakit yang disebabkan oleh *A. hydrophila* pertama kali dikenal di Indonesia pada tahun 1980 di Jawa Barat. Penyakit ini menyerang ikan karper dan menyebabkan kematian hingga 125 ton (IDRC dalam Olga, 2012).

Ikan yang terserang bakteri *A. hydrophila* menunjukkan tanda-tanda seperti kemampuan berenang yang menjadi lemah, nafasnya pendek dan sering muncul ke permukaan, menurunnya nafsu makan, warna insang pucat dan rusak, warna tubuh menjadi gelap, kulit mengeluarkan lendir berlebih yang diikuti oleh pendarahan yang kemudian akan menjadi borok, perut ikan membuncit dan mata menonjol, terdapat bercak merah pada bagian luar tubuhnya, serta terjadi kerusakan pada sirip (Junianto dan Maulina, 2007).

2.4.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas adalah bakteri yang tersebar luas di lingkungan dan merupakan salah satu patogen yang penting bagi manusia. *P. aeruginosa* dan spesies lain tahan terhadap banyak antimikroba. Beberapa spesies *Pseudomonas* memiliki kepekaan terhadap antibiotik yang berbeda dengan *P. aeruginosa* (Anonim, 1997). Pada umumnya, *P. aeruginosa* adalah bakteri gram negatif yang bersifat aerobik, bakteri ini berbentuk batang dan memiliki flagel, dapat tumbuh di tanah, rawa-rawa, bahkan pesisir pantai serta pada jaringan tanaman dan hewan (Hardalo dan Edberg, 1997).

Klasifikasi *P. aeruginosa* menurut Bergey's (1994) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Prokaryota
Divisi : Gracilicutes
Kelas : Schyzomycetes
Ordo : Eubacteriales

Family : Pseudomonadaceae
Genus : Pseudomonas
Spesies : *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa berukurannya 1,5-3 µl x 0,5 µl, bergerak aktif serta mempunyai 1 flagel pada ujung sel, tetapi beberapa strain mempunyai 2 atau 3 flagel. *P. aeruginosa* bersifat aerob obligat yang dapat tumbuh pada berbagai media dan terkadang menghasilkan bau buah anggur. Suhu untuk pertumbuhan antara 5-42 °C dengan suhu optimal 37 °C (Anonim, 1997).

Bakteri *P. aeruginosa* dapat dikembangkan secara in vitro dan dapat tumbuh dengan baik pada medium agar *centrimede* dan menghasilkan warna biru kehijauan karena pigmen pyocyanin, namun hal yang berbeda ditunjukkan pada medium agar *MacConkey* yang tidak menghasilkan warna. *P. aeruginosa* dapat menghasilkan enzim katalase, oksidase dan lipase serta membutuhkan nutrisi yang sangat minimal dalam perkembangannya yang dibuktikan dapat tumbuh pada air yang telah terdestilasi. Di laboratorium, medium paling sederhana untuk pertumbuhan bakteri ini terdiri dari asetat sebagai sumber karbon dan amonium sulfat sebagai sumber nitrogen (Bevec, 2010).



Gambar 4. *Pseudomonas aeruginosa* (Sumber: news-medical.net)

2.4.3. *Vibrio alginolyticus*

Vibrio termasuk dalam salah satu bakteri patogen yang termasuk dalam famili Vibrionaceae dan bersifat kosmopolitan dengan penyebaran yang sangat luas. Bakteri *Vibrio* adalah bakteri gram negatif yang berbentuk batang bengkok, oksidase dan katalase positif, memfermentasikan glukosa tanpa menghasilkan gas dan mempunyai flagel polar (Bauman, 2001). *Vibrio* sangat umum dijumpai di air payau dan laut namun juga dapat hidup di perairan tawar. Sebagian bersifat saproba namun ada beberapa spesies yang menyebabkan penyakit vibriosis pada hewan akuatik termasuk ikan.

Klasifikasi bakteri *V. alginolyticus* menurut Feliatra (1999) adalah:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Vibrionales
Famili	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Spesies	: <i>Vibrio alginolyticus</i>

Gejala klinis penyakit vibriosis bentuk akut pada ikan dewasa ditandai dengan warna kulit berubah kusam disertai menurunnya nafsu makan, kerusakan kulit dengan tepi merah atau putih karena infeksi sekunder jamur. Organ viseral, jantung dan kulit terjadi hemoragi difus, membengkak, distensi abdomen dengan asites. Pada penyebaran yang cepat, penyakit dapat menyebabkan ikan mati dalam 2-3 hari dengan mortalitas tinggi. Biasanya dalam keadaan stres ikan tampak berwarna kusam (gelap) dengan kerusakan pada sirip dan ekor, insang pucat. Saat

dibedah akan terlihat pembengkakan dengan kerusakan diseluruh permukaan organ internal dan terdapat cairan serosanguinus pada ginjal dan limpa yang membengkak (Spira *et al.*, 1981).

Bakteri *V. alginolyticus* mudah dibedakan dari spesies vibrio lain karena bersifat mengeriyap (*swarming*). Menurut Barrow dan Feltham (1993) sifat mengeriyap adalah sifat khas dari bakteri *V. alginolyticus*, karena pada media padat bakteri ini mensintesa flagela lateral yang banyak. *V. alginolyticus* mempunyai ciri berwarna kuning, diameter 3-5 μ l.



Gambar 5. *Vibrio alginolyticus* (Sumber: microbe-canvas.com)

2.5. Uji Antagonis

Antagonis adalah peristiwa yang menyebabkan tertekannya aktivitas mikroorganisme jika terdapat dua atau lebih mikroorganisme yang berada pada tempat yang berdekatan. Uji antagonis adalah uji yang digunakan untuk membuktikan apakah mikroorganisme yang bersifat antagonis dapat menghambat aktivitas mikroorganisme lain yang berada pada tempat yang berdekatan. Mikroorganisme yang bersifat antagonis memiliki pertumbuhan yang cepat sehingga dapat menutupi mikroorganisme yang berdekatan dengannya (Tuju, 2004).

Aktivitas antagonis dapat melalui beberapa cara, misalnya produksi metabolit sekunder, kompetisi dan parasitisme langsung (Mari dan Guizzardi, 1998). Mikroorganisme yang bersifat antagonis dapat langsung menghambat patogen dengan sekresi antibiotik, berkompetisi dengan patogen untuk mendapatkan makanan atau tempat (Nasahi, 2010).

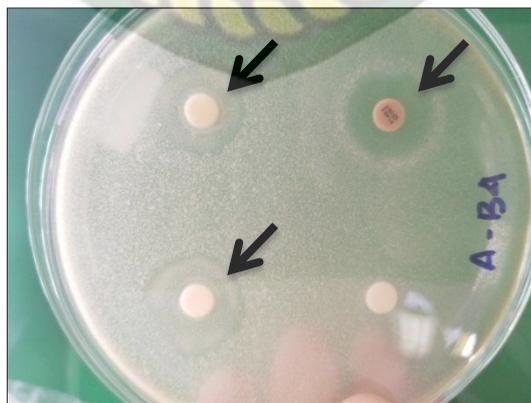
Uji antagonis mikrobiologi memanfaatkan mikroorganisme sebagai indikator pengujian dimana mikroorganisme ini digunakan sebagai penentu konsentrasi komponen tertentu pada campuran kimia kompleks. Uji anti mikroba digunakan untuk memperoleh sistem pengobatan yang efektif dan efisien. Menurut Pelczar (1986) terdapat beberapa metode untuk melakukan uji anti mikroba, yaitu:

Pertama Metode Difusi: a). Metode *Disc Diffusion*, digunakan untuk menentukan aktivitas anti mikroba. Cakram yang telah diberi atau direndam mikroba atau anti mikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanam mikroorganisme atau patogen, b). Metode *E-test*, digunakan untuk mengestimasi MIC (*minimum inhibitor concentration*) atau konsentrasi minimum anti mikroba untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Menggunakan strip plastik yang mengandung anti mikroba mulai dari kadar terendah sampai tertinggi yang diletakkan pada media agar yang telah ditanam mikroorganisme atau patogen, c). Metode *Ditch-plate technique*, sampel anti mikroba diletakkan pada media agar yang telah dipotong membujur pada bagian tengahnya kemudian mikroba uji digoreskan pada tepian parit yang sudah berisi anti mikroba, d). Metode *Cup-plate technique*, melubangi media yang sudah ditanami mikroorganisme atau patogen dan meletakkan cakram anti mikroba di dalamnya, e). Metode *Gradient plate*

technique, konsentrasi anti mikroba bervariasi mulai dari nol sampai maksimal. Media agar dicairkan dan ditambahkan larutan uji kemudian dituangkan ke cawan petri dengan posisi miring, tambahkan nutrisi kedua dan inkubasi selama 24 jam lalu gores mikroba uji mulai dari konsentrasi terendah sampai yang tertinggi.

Metode yang kedua yaitu Metode Dilusi: a). Metode Dilusi Cair, untuk mengukur MIC (kadar hambat minimum) dan MBC (kadar bunuh minimum) dengan media cair, b). Metode Dilusi Padat, untuk mengukur MIC (kadar hambat minimum) dan MBC (kadar bunuh minimum) dengan media padat.

Kriteria keefektifan hasil uji antagonisme secara *in vitro* dalam *screening* dilihat dari terbentuk atau tidaknya zona hambatan, zona hambat adalah zona bening yang terbentuk diantara patogen dan agen antagonis. Terbentuknya zona hambat menandakan bahwa agen biokontrol memproduksi suatu senyawa antimikrobia baik berupa enzim, toksin maupun antibiotik. Antibiotik adalah substansi yang dihasilkan oleh organisme hidup yang dalam konsentrasi rendah dapat menghambat sampai membunuh organisme lain. Antibiotik tergolong dalam metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroorganisme antagonis dalam jalur metabolisme (Maria, 2002).



Gambar 6. Zona Bening pada Uji Antagonis (Sumber: Dokumentasi)

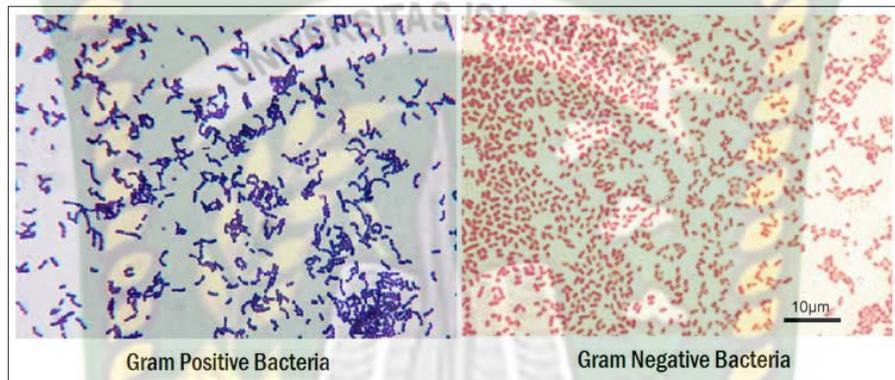
2.6. Identifikasi Bakteri

Identifikasi adalah usaha yang dilakukan untuk mengetahui nama atau jenis dari suatu organisme atau makhluk hidup pada kelompok tertentu berdasarkan karakteristik yang dimiliki makhluk hidup tersebut. Identifikasi mikroorganisme dilakukan dengan membandingkan ciri yang ada dan belum diketahui dengan yang sudah diketahui. Identifikasi mikroorganisme baru memerlukan perincian, deskripsi serta perbandingan yang cukup dengan yang sebelumnya telah dipublikasikan pada jasad renik lain yang serupa (Pelczar dan Chan, 1989). Menurut Susatyo (2006) identifikasi merupakan kegiatan yang dilakukan untuk mengetahui jenis organisme tertentu melalui beberapa tahap yaitu pengamatan, pengujian dan pencatatan.

Identifikasi dilakukan dengan mengamati organisme secara morfologi dan fisiologi. Pengamatan secara morfologi meliputi bentuk koloni, struktur koloni, bentuk sel, ukuran sel, bentuk flagel dan pewarnaan endospore bakteri, sedangkan pengamatan secara fisiologi dilakukan dengan uji biokimia. Selain itu, identifikasi bakteri juga dapat dilakukan dengan metode PCR (*polymerase chain reaction*) atau dengan mengekstrak DNA bakteri yang kemudian diperbanyak dan dielektroforesis, dari hasil ini akan diketahui karakteristik dari DNA yang dimiliki bakteri tersebut (Suryanto, 2004).

Beberapa uji yang biasa digunakan dalam identifikasi bakteri yaitu pemeriksaan morfologi, pewarnaan gram dan uji biokimia, uji biokimia meliputi uji O/F, uji SCA, uji katalase, uji motilitas, produksi indol, uji TSIA dan uji gula (Beisher, dalam Kusdarwati dan Sudarno, 2011).

Salah satu teknik identifikasi bakteri lainnya yaitu dengan cara pewarnaan gram, teknik ini sangat penting dilakukan untuk mengetahui jenis dari bakteri yang diidentifikasi. Bakteri tergolong dalam dua jenis, yaitu bakteri gram positif atau bakteri yang dapat menyerap warna violet atau biru tua pada saat pewarnaan dan bakteri gram negatif atau bakteri yang dapat menyerap warna merah saat pewarnaan gram.



Gambar 7. Pewarnaan Gram pada Bakteri (Sumber: alponsin.wordpress.com)

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Benih Ikan (BBI) Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau Pekanbaru dimulai pada bulan Agustus sampai bulan September 2020. Uji PCR dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Universitas Riau dan analisis sekuensing dilakukan di PT. Genetika Science Indonesia Jakarta Barat.

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada saat penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Alat Penelitian.

No	Nama Alat	Jumlah	Kegunaan
1	Autoclave	1 Unit	Sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan
2	Timbangan analitik	1 Unit	Menimbang media yang dibutuhkan
3	Kaca arloji	1 Buah	Wadah media saat penimbangan
4	Sendok	1 Buah	Mengambil media yang akan digunakan
5	Erlenmeyer 250 ml	1 Buah	Wadah untuk memanaskan media
6	Erlenmeyer 50 ml	8 Buah	Wadah untuk kultur bakteri dan patogen
7	Hot plate	1 Unit	Memanaskan media yang akan digunakan
8	Magnetik stirer	1 Buah	Mengaduk media saat pemanasan di hot plate
9	Laminary air flow	1 Unit	Tempat menanam dan infeksi bakteri
10	Cawan petri	35 Buah	Tempat media agar dan kultur bakteri
11	Tabung reaksi	16 Buah	Tempat pengenceran isolat dari ikan sapu-sapu dan tempat media agar miring
12	Gelas ukur 250 ml	1 Buah	Menakar aquades
13	Gelas ukur 25 ml	1 Buah	Menakar agar yang akan dimasukkan ke cawan petri
14	Vortex	1 Unit	Menghomogenkan sampel isolat dari usus ikan sapu-sapu

15	Alumunium foil	1 Roll	Menutup wadah media
16	Rak tabung reaksi	2 Buah	Tempat meletakkan tabung reaksi
17	Pancing jaring	2 Buah	Alat tangkap ikan sapu-sapu
18	Alat bedah	1 Set	Membedah ikan sapu-sapu
19	Micro pipet 10-100 µl	1 Buah	Meneteskan sampel isolat dari usus ikan sapu-sapu ke media agar
20	Micro pipet 100-1000 µl	1 Buah	Mengambil sampel isolat dari usus ikan sapu-sapu
21	Jarum ose	2 Buah	Infeksi bakteri dan patogen ke media agar dan broth
22	Bunsen	2 Buah	Sterilisasi jarum ose
23	Batang L	1 Buah	Menyebarkan sampel pada media agar
24	Beaker glass 50 ml	1 Buah	Wadah meletakkan batang L
25	Beaker glass 20 ml	7 Buah	Wadah kertas cakram dan cakram antibiotik yang akan digunakan
26	Pinset	1 Buah	Mengambil kertas cakram dan cakram antibiotik
27	Inkubator	1 Unit	Tempat inkubasi dan pembiakan bakteri
28	Jangka sorong	1 Buah	Mengukur diameter daya hambat

3.2.1. Bahan Penelitian

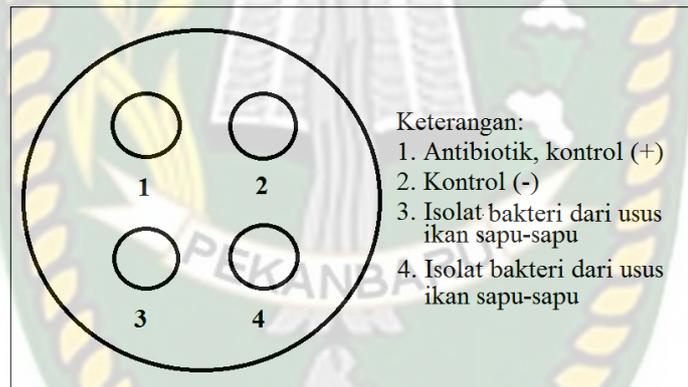
Bahan yang digunakan pada saat penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Bahan Penelitian.

No	Nama Bahan	Kegunaan
1	Nutrien Agar (NA)	Media isolasi, kultur dan pemurnian bakteri dan patogen
2	Nutrien Broth (NB)	Media pemurnian bakteri
3	Aquades	Pelarut media agar dan broth
4	Ikan sapu-sapu	Bahan sampel uji
5	Alkohol	Sterilisasi
6	Spiritus	Bahan bakar bunsen
7	Bakteri <i>A. hydrophila</i>	Bakteri patogen uji antagonis
8	Bakteri <i>P. aeruginosa</i>	Bakteri patogen uji antagonis
9	Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	Bakteri patogen uji antagonis
10	Kertas cakram	Uji antagonis
11	Kertas cakram yang mengandung antibiotik oksitetrasiklin	Kontrol positif uji antagonis

3.3. Metode Penelitian

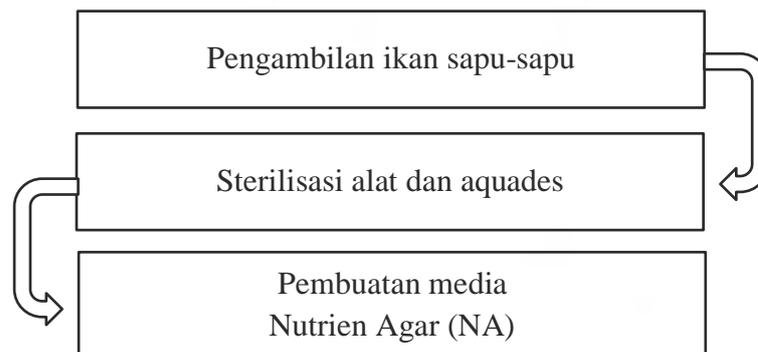
Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif yang bertujuan untuk mengamati reaksi antagonis isolat dari usus ikan sapu-sapu (*H. plecostomus*) terhadap bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*. Metode eksplorasi merupakan metode penelitian dengan melakukan pengamatan pada permasalahan yang terjadi. Sedangkan rancangan yang digunakan yaitu dengan metode disk difusi atau tes Kirby Bauer, terdiri dari satu kertas cakram yang mengandung antibiotik oksitetrasiklin (+), satu kertas cakram kontrol (-) dan dua kertas cakram yang sudah direndam bahan uji (isolat dari usus ikan sapu-sapu). Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 8.

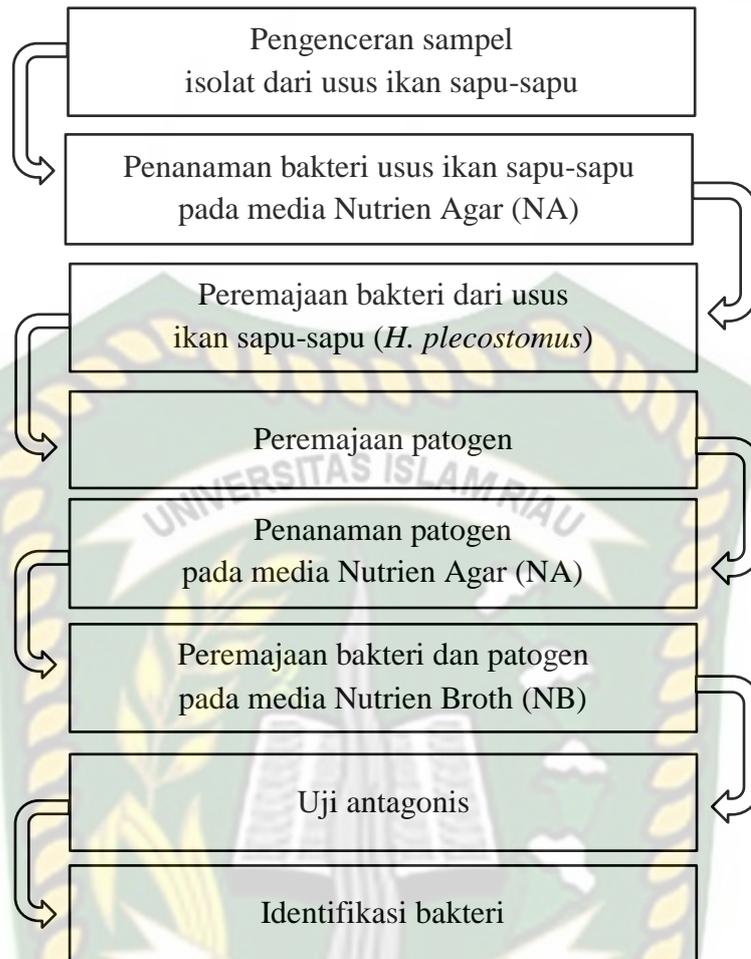


Gambar 8. Rancangan Penelitian

3.4. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan seperti yang terdapat pada Gambar 9.





Gambar 9. Skema Prosedur Penelitian

3.4.1. Pengambilan Ikan Sapu-sapu (*H. plecostomus*)

Ikan sapu-sapu (*H. plecostomus*) yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari aliran sungai di daerah Teropong. Pengambilan dilakukan dengan menggunakan pancing jaring, ikan sapu-sapu yang didapat kemudian dimasukkan ke wadah untuk di bawa ke Balai Benih Ikan (BBI) Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau untuk diletakkan di dalam bak semen.

3.4.2. Sterilisasi Alat dan Aquades

Peralatan berbahan kaca yang akan digunakan terlebih dahulu direbus, di cuci dengan sabun dan dibilas dengan air bersih, setelah dicuci alat kaca tersebut

dibungkus dengan plastik bening untuk kemudian di masukkan ke dalam autoclave dan disterilisasi selama 20 menit dengan suhu 121°C.

Sterilisasi aquades, pertama aquades dimasukkan ke dalam erlenmeyer sebanyak 1000 ml, selanjutnya tutup bagian atas erlenmeyer dengan menggunakan alumunium foil dan dimasukkan ke dalam autoclave untuk disterilisasi selama 20 menit pada suhu 121°C.

Sterilisasi dilakukan untuk membersihkan alat sehingga tidak ada mikroba yang tumbuh. Teknik sterilisasi yang paling sering digunakan adalah sterilisasi menggunakan uap air panas bertekanan atau menggunakan autoclave. Suhu atau tekanan tinggi yang diberikan kepada alat dan media memberikan kekuatan yang lebih besar untuk membunuh sel dibanding dengan udara panas. Biasanya untuk mesterilkan media digunakan suhu 121°C selama 15 menit dan alat selama 30 menit (Fardiaz, 1992).

3.4.3. Pembuatan Media Nutrien Agar (NA)

Pembuatan media Nutrient Agar (NA) dengan menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan yaitu media Nutrien Agar (NA), aquades, timbangan analitik yang sudah dikalibrasi, sendok, kaca arloji, magnetik stirer, erlenmeyer 250 ml, erlenmeyer 50 ml, gelas ukur, hot plate dan 10 cawan petri.

Timbang Nutrien Agar (NA) sebanyak 0,2 gram, masukkan ke dalam erlenmeyer dan tambahkan aquades sebanyak 150 ml, larutkan sampai homogen kemudian dipanaskan dengan suhu 200 °C hingga mendidih pada hot plate. Setelah mendidih angkat dan dinginkan sebentar kemudian takar sebanyak 15 ml dan masukkan ke dalam erlenmeyer 50 ml, tutup bagian atasnya dengan

aluminium foil dan disterilkan dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Setelah 15 menit kemudian media Nutrien Agar (NA) dipindahkan ke laminar air flow, tunggu sekitar 2-3 menit lalu tuangkan ke cawan petri, diamkan sampai media agar dingin dan mengeras.

3.4.4. Pengenceran Sampel Isolat dari Usus Ikan Sapu-sapu (*H. plecostomus*)

Pengenceran adalah proses yang dilakukan untuk menurunkan konsentrasi suatu larutan dengan menambahkan pelarut sehingga konsentrasi dan volumenya berubah (Aryanti, 2017).

Proses pengenceran isolat dari usus ikan sapu-sapu dimulai dengan menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan. Pertama-tama yaitu siapkan tabung reaksi sebanyak 10 buah yang sudah di sterilkan, isi 8 tabung reaksi dengan aquades sebanyak 9 ml dan 2 tabung reaksi lainnya diisi aquades sebanyak 10 ml (10 tabung reaksi untuk 2 kali ulangan). Tandai mulai dari yang berisi 10 ml (10^{-1} sampai dengan 10^{-5}).

Bedah ikan sapu-sapu dan ambil ususnya sepanjang 15 cm kemudian potong-potong, masukkan sama banyak pada tabung reaksi 10^{-1} ulangan pertama dan kedua. Aduk menggunakan vortex sampai tercampur rata, selanjutnya dari pengenceran 10^{-1} diambil 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung 10^{-2} dan seterusnya sampai pengenceran 10^{-5} lakukan hal yang sama untuk ulangan kedua.

3.4.5. Penanaman Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu pada Media Nutrien Agar (NA)

Untuk penanaman bakteri, terlebih dahulu buat media Nutrien Agar (NA) untuk 10 cawan petri, kemudian saat sudah mengeras tandai dengan label bertuliskan NA₁ 1 sampai NA₁ 5, kemudian NA₂ 1 sampai NA₂ 5 (pisahkan sesuai pengenceran yang dilakukan sebelumnya). Penanaman bakteri isolat dari usus ikan sapu-sapu ke media NA ini dilakukan dengan metode sebar (*spread plate*).

Metode sebar dilakukan dengan cara menyemprotkan atau meletakkan isolat dari usus ikan sapu-sapu sebanyak 50 µl atau 0,05 ml ke atas media agar kemudian menyebarkan secara merata dengan menggunakan batang L. Setelah penyebaran bakteri selesai, seluruh media yang sudah ditanami bakteri kemudian disimpan dalam inkubator pada suhu 30 °C selama 24 jam. Inkubasi adalah penyimpanan media dalam inkubator pada temperatur dan periode tertentu sehingga menciptakan lingkungan yang kondisinya cocok untuk pertumbuhan bakteri (Harley dan Presscot, 2002).

3.4.6. Peremajaan Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu (*H. plecostomus*)

Peremajaan bakteri dilakukan pada cawan petri, prosedurnya sama dengan proses penanaman bakteri namun pada peremajaan ini bakteri yang dibiakkan adalah bakteri yang memiliki bentuk atau koloni yang berbeda-beda, bakteri atau koloni ini diambil dari penanaman sebelumnya. Dari sepuluh cawan yang sudah ditanami bakteri, dipilih lima bakteri yang bentuknya berbeda untuk kemudian di remajakan, pemilihan lima bakteri berbeda bentuk ini diharapkan adalah bakteri dari jenis yang berbeda pula.

Nutrien Agar (NA) sebanyak 1,5 gram ditambah 75 ml aquades, homogenkan pada hot plate dan rebus sampai mendidih dalam autoclave. Setelah direbus dimasukkan ke dalam cawan petri dan tunggu hingga mengeras. Setelah media agar mengeras, lima bakteri yang sudah ditandai sebelumnya kemudian dikultur pada masing-masing cawan dengan metode gores menggunakan jarum ose kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30 °C selama 24 jam.

3.4.7. Peremajaan Bakteri Patogen

Peremajaan patogen adalah proses pananaman ulang patogen yang sebelumnya sudah ada ke media yang baru untuk mempertahankan ketersediaan patogen atau bakteri tersebut, patogen yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*. Peremajaan bakteri patogen dilakukan pada media agar miring, untuk membuat media agar miring pertama siapkan enam buah tabung reaksi yang sudah disterilisasi.

Timbang Nutrien Agar (NA) sebanyak 1,08 gr dan tambahkan dengan aquades sebanyak 54 ml. proses pembuatan media pada agar miring sama dengan pembuatan media pada cawan petri. Setelah media NA dipanaskan dan disterilisasi, tuangkan media ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 ml, miringkan tabung reaksi dan dinginkan sampai media NA di dalamnya mengeras. Setelah media agar mengeras, tanam patogen masing masing dua kali ulangan dengan metode gores menggunakan jarum ose, tandai setiap cawan sesuai patogen didalamnya kemudian inkubasi dalam inkubator pada suhu 30 °C selama 24 jam.

3.4.8. Penanaman Bakteri Patogen pada Media Nutrien Agar (NA)

Proses penanaman patogen sama dengan proses kultur bakteri, dilakukan pada cawan petri sebanyak enam buah dan dilakukan dengan metode gores

menggunakan jarum ose, tandai setiap cawan sesuai jenis patogen didalamnya kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30 °C selama 24 jam.

3.4.9. Peremajaan Bakteri dan Patogen pada Media Nutrien Broth (NB)

Nutrient Broth (NB) adalah media yang digunakan untuk kultur bakteri dan patogen yang berbentuk cair atau *liquid*. Pembuatan media NB untuk delapan erlenmeyer yaitu pertama timbang NB sebanyak 0,96 gr kemudian tambahkan aquades sebanyak 120 ml dan homogenkan. Panaskan di atas hot plate dengan suhu 200 °C sambil diaduk dengan magnetik stirer hingga berbuih dan bening. Sterilkan pada autoclave pada suhu 121 °C selama 20 menit.

Media NB yang sudah di sterilkan kemudian didinginkan di dalam laminar air flow, setelah media dingin tanam lima bakteri yang sebelumnya sudah di kultur dan patogen *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* pada masing-masing erlenmeyer dengan cara ambil bakteri pada cawan petri menggunakan jarum ose steril kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer yang sudah berisi NB yang dingin, aduk sampai homogen dan tutup bagian atasnya dengan menggunakan aluminium foil. Lakukan hal yang sama pada bakteri yang lain kemudian tandai tiap erlenmeyer sesuai bakteri yang dikultur dengan B-1 sampai B-5 lakukan hal yang sama juga pada kultur patogen, pastikan proses kultur bakteri dilakukan secara aseptis. Setelah semua bakteri dan patogen ditanam dalam NB, simpan dalam inkubator pada suhu 30 °C selama 24 jam.

3.4.10. Uji Antagonis

Uji antagonis dilakukan pada isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu dengan bakteri patogen *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*. Pertama-tama siapkan media NA untuk lima belas cawan petri karena masing-

masing bakteri akan diuji dengan tiga patogen yang berbeda. Untuk lima cawan petri pertama yang digunakan untuk media agar yang dicampur dengan bakteri *A. hydrophila* timbang NA sebanyak 1,5 gr kemudian tambahkan aquades sebanyak 75 ml dan homogenkan. Panaskan di atas hot plate dengan suhu 200 °C sambil diaduk dengan magnetik stirer hingga berbuih dan bening. Sterilkan pada autoclave dengan suhu 121 °C selama 20 menit.

Setelah 20 menit, matikan autoclave dan keluarkan tiga erlenmeyer dan letakkan di dalam laminar air flow sedangkan dua sisanya tetap dibiarkan dalam autoclave agar tetap hangat, diamkan tiga media yang ada di dalam laminar air flow sampai suhunya sekitar 50 °C setelah itu masukkan bakteri *A. hydrophila* yang dikultur pada media NB sebanyak 50 µl pada masing-masing erlenmeyer yang berisi media NA, homogenkan kemudian tuangkan pada cawan petri dan dinginkan sampai media mengeras, lakukan hal yang sama pada dua media yang ada di dalam autoclave. Lakukan hal yang sama untuk bakteri *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*.

Setelah media mengeras, kemudian dilakukan uji antagonis, siapkan alat dan bahan yang dibutuhkan yaitu micro pipet, bunsen, beaker glass 20 ml, pinset, kertas cakram biasa, kertas cakram yang mengandung antibiotik oksitetrasiklin dan isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu yang sudah di kultur pada media NB. Uji antagonis dilakukan berurut perbakteri patogen, pertama pisahkan media yang sudah ditanami bakteri patogen *A. hydrophila*, siapkan enam beaker glass dan masukkan masing-masing dua kertas cakram biasa dan dua kertas cakram yang mengandung antibiotik oksitetrasiklin pada satu beaker glass terpisah. Pisahkan satu beaker glass untuk perlakuan kontrol di mana kertas cakram tidak diberikan

apapun, urutkan dan beri nomor satu sampai lima kemudian pada beaker glass berisi dua kertas cakram nomor satu teteskan bakteri B-1 sebanyak 50 µl dan diamkan sekitar dua menit sampai meresap kemudian letakkan di atas media agar yang berisi kultur bakteri patogen, letakkan juga kertas cakram yang mengandung antibiotik oksitetrasiklin dan kertas cakram perlakuan kontrol negatif dengan jarak yang sama, kemudian beri label untuk menandai jenis patogen dan bakteri yang ada pada media agar. Selanjutnya diamkan dalam inkubator pada suhu 30 °C selama 24 jam.

Pada hari berikutnya, bakteri yang sudah di lakukan uji antagonis akan terdapat penghambatan pada sekitaran kertas cakram berupa zona bening, zona bening ini kemudian diukur diameternya menggunakan jangka sorong dan dicatat. Menurut Rahmiati (2017) besar atau kecilnya zona hambat dipengaruhi oleh kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan enzim hidrolitik, umur biakan bakteri, jumlah enzim yang dihasilkan, komposisi media dan waktu inkubasi.

3.4.11. Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri yang berasal dari usus ikan sapu-sapu, menggunakan metode 16S rDNA untuk mengetahui nama spesies bakteri B1, B3 dan B4.

3.4.12. Uji PCR (Polimerase Chain Reaction)

Uji PCR dilakukan dengan mencampurkan bahan-bahan 1x *buffer* PCR 5 µl, 2mM dNTP 5 µl, 5 Unit dt 0,25 µl dan aquades 36,75 µl, selanjutnya dilakukan pipeting untuk menghomogenkan seluruh bahan, lalu bahan tersebut dimasukkan ke dalam tube khusus PCR. Selanjutnya dimasukkan DNA bakteri sebanyak 1 µl dan ditambahkan Primer 24F: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CT 3' dan 1541R: 5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3' masing-masing sebanyak

1 µl, sehingga diperoleh seluruh bahan berjumlah 50 µl seperti Tabel 3.3. berdasarkan tabel tersebut, untuk menentukan nilai volume yang dibutuhkan digunakan perhitungan dengan menggunakan persamaan:

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

Dimana: N1 : Komponen PCR V1 : Volume yang dibutuhkan
 N2 : Konsentrasi akhir V2 : Total volume yang dibutuhkan

Setelah semua bahan tercampur, selanjutnya tube PCR dimasukkan ke dalam alat PCR dan diseting dengan beberapa tahap antara lain: Pra PCR pada suhu 90°C selama 5 menit, Denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, Anealing pada suhu 50°C selama 45 detik dan Extension pada suhu 72°C selama 90 detik (tahap Denaturasi, Anealing dan Extension dilakukan sebanyak 35 siklus) serta yang terakhir adalah pasca PCR pada suhu 72°C selama 10 menit.

Tabel 3.3. Komponen PCR untuk Amplifikasi DNA Bakteri.

Komponen	Konsentrasi Akhir	Volume (µl)
10 X <i>Dream Taq buffer</i>	1 X	5,0
2 mM dNTP <i>mix</i>	0,2 mM	5,0
10 µM Primer F	0,4 µM	2,0
10 µM Primer R	0,4 µM	2,0
5 U/µl <i>Dream Taq DNA Polimerase</i>	1,25 Unit	0,25
DNA <i>Template</i>	-	2,0
ddH ₂ O	-	33,75
Total		50,0

3.4.13. Elektroforensis DNA

Kualitas dan kuantitas DNA total diperiksa menggunakan gel agarosa. Elektroforesis DNA total dilakukan menggunakan 1% gel agarosa dan 2 µl larutan *etidium bromida* (EtBr) (sebagai pewarna pita DNA) dalam larutan 1x TBE (*Tris Boric Acid-EDTA* pH 8.0). Cetakan yang berisi gel dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang berisi 1x *buffer* TBE, sebagai penanda digunakan

sebanyak 2 μ l 1 kb DNA ladder + 2 μ l loading dye yang dimasukkan ke dalam sumur gel di dalam alat elektroforesis secara perlahan. Elektroforesis dijalankan dengan tegangan 50 volt selama 40 menit, gel divisualisasi dengan meletakkan gel elektroforesis di atas UV transiluminator. Profil pita DNA difoto dengan menggunakan kamera digital Olympus berfilter UV.

3.5. Parameter Penelitian

Parameter yang diamati dalam penelitian ini yaitu:

1. Pengujian daya hambat bakteri dari usus ikan sapu-sapu terhadap bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*.
2. Identifikasi jenis bakteri dari usus ikan sapu-sapu.

8.6. Hipotesis dan Asumsi

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah:

- H0: Isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu tidak bersifat antagonis untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*.
- H1: Isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu bersifat antagonis untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*.

Sedangkan asumsi yang diajukan dalam penelitian ini antara lain:

1. Tingkat virulensi bakteri patogen *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* dianggap sama.
2. Keadaan lingkungan dan kebersihan alat laboratorium dianggap sama.
3. Tingkat keterampilan dan ketelitian peneliti dianggap sama.

3.7. Analisis Data

Data yang diamati selama melakukan penelitian ini berupa aktifitas bakteri antagonis isolat dari usus ikan sapu-sapu terhadap bakteri patogen serta mengidentifikasi isolat dari usus ikan sapu-sapu yang memiliki hasil terbaik pada saat uji antagonis. Data yang diperoleh berdasarkan penelitian yang dilakukan kemudian dianalisis secara deskriptif dan dukungan studi literatur.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Uji Antagonis

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Benih Ikan (BBI) Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau, tentang pengujian antagonis bakteri yang berasal dari usus ikan sapu-sapu terhadap pertumbuhan bakteri patogen *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* diperoleh hasil rata-rata diameter zona hambat seperti yang tertera pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Rata-rata Diameter Zona Hambat Uji Antagonis Terhadap Pertumbuhan Bakteri Patogen (mm)

Isolat Bakteri	<i>A. hydrophila</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>V. alginolyticus</i>
B1	7.5	11	10.25
B2	8.75	7	8.25
B3	15.25	10.75	8.75
B4	16.25	14.75	18
B5	7	7.5	11
Kontrol +	17	15.1	34.1
Kontrol -	0	0	0

Dari Tabel 4.1 dapat dilihat bahwa rata-rata diameter zona hambat pada setiap isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu terhadap pertumbuhan bakteri patogen berbeda-beda dan rata-rata diameter zona hambat terbesar terdapat pada isolat bakteri B4. Rata-rata diameter zona hambat isolat bakteri B4 terhadap pertumbuhan bakteri patogen *A. hydrophila* sebesar 16,25 mm, terhadap pertumbuhan bakteri patogen *P. aeruginosa* sebesar 14,75 mm dan terhadap pertumbuhan bakteri patogen *V. alginolyticus* yaitu sebesar 18 mm.

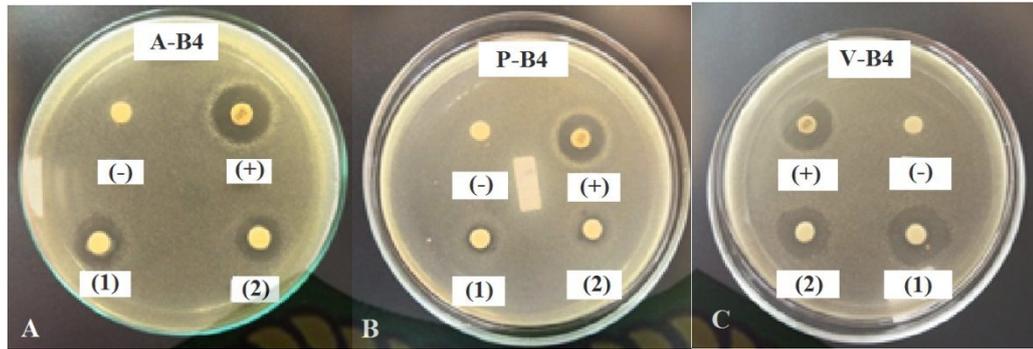
Zona hambat isolat bakteri B4 terhadap pertumbuhan ketiga bakteri patogen tergolong kuat, isolat bakteri B3 tergolong kuat terhadap pertumbuhan bakteri patogen *A. hydrophila* dan *P. aeruginosa* dan tergolong sedang terhadap

pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*, isolat bakteri B1 tergolong kuat terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* dan tergolong sedang terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, isolat bakteri B2 terhadap pertumbuhan ketiga bakteri patogen tergolong sedang, isolat bakteri B5 tergolong kuat terhadap bakteri *V. alginolyticus* dan tergolong sedang terhadap bakteri *P. aeruginosa* dan *A. hydrophila*.

Menurut Greenwood *dalam* Susana (2017) apabila respon atau zona hambat yang dihasilkan pada saat uji antagonis lebih besar dari 20 mm maka respon hambatnya sangat kuat, apabila diameter zona hambatnya berkisar antara 10-20 mm maka respon hambatnya dikategorikan kuat, apabila diameter zona hambatnya antara 5-10 mm dikategorikan sedang dan apabila diameter zona hambatnya kurang dari 5 mm maka respon hambatnya dikategorikan lemah.

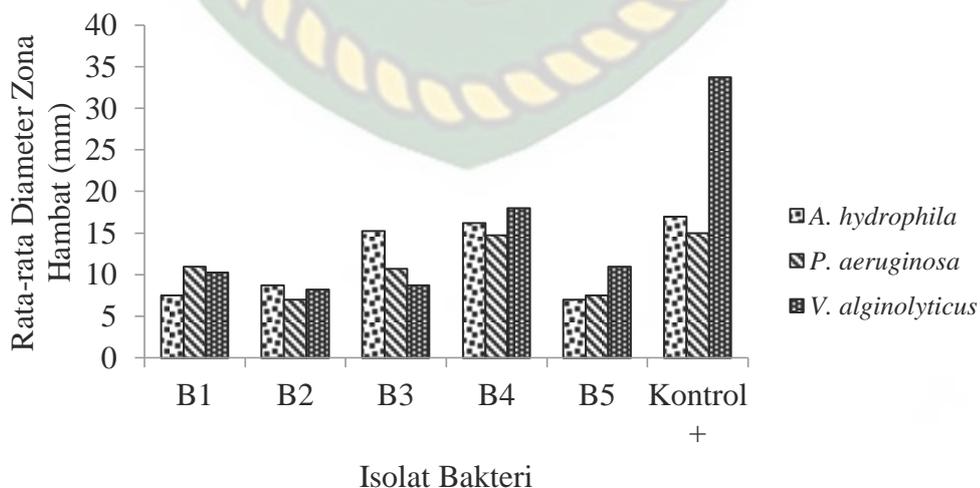
Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan David dan Stout (2007) uji antagonis apabila memiliki daerah hambatan 20 mm atau lebih, berarti kekuatan antibakterinya sangat kuat. Bila daerah hambatnya antara 10-20 mm, maka kekuatan antibakterinya kuat. Bila daerah hambatnya antara 5-10 mm, kekuatan antibakterinya sedang dan bila daerah hambatnya 5 mm atau kurang dari 5 mm, maka aktivitas antibakterinya tergolong lemah.

Pan *et al.*, (2009) melaporkan bahwa kategori daya hambat antimikroba berdasarkan diameternya dibagi menjadi 3 yaitu, jika diameternya 0-3 mm respon hambat pertumbuhannya termasuk lemah. Jika diameternya 3-6 mm respon hambat pertumbuhannya tergolong sedang. Apabila diameter zona hambatnya lebih dari 6 mm maka respon hambat pertumbuhannya termasuk kuat.



Gambar 10. Hasil Zona Hambat Uji Antagonis Bakteri B-4 pada Bakteri Patogen (A) *A. hydrophila*, (B) *P. aeruginosa* dan (C) *V. alginolyticus*.

Terciptanya zona hambat pada uji antagonis dikarenakan adanya kandungan senyawa-senyawa yang bersifat antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri yang berasal dari usus ikan sapu-sapu. Zona hambat yang terbentuk ini menandakan bahwa bakteri dari usus ikan sapu-sapu dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen, sehingga bakteri patogen tidak dapat tumbuh di daerah sekitaran cakram. Hal ini sesuai dengan pendapat Ritonga (1992) bahwa probiotik dapat memberikan keseimbangan mikrobiota dalam saluran pencernaan yang mengalami perubahan akibat masuknya patogen, sehingga patogen tersebut dapat ditekan populasinya melalui pengaruh antimikroba yang ada pada probiotik.



Gambar 11. Rata-rata Diameter Zona Hambat Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu pada Uji Antagonis.

Sari *et al.*, (2013) menyatakan terbentuknya zona hambat pada media agar disebabkan oleh penghambatan senyawa antimikroba pada sel-sel mikroba. Mekanisme kerja senyawa antimikroba yaitu mengganggu atau merusak penyusun pada dinding sel, kemudian bereaksi dengan membran sel yang mengakibatkan peningkatan permeabilitas seluler, inaktivasi enzim-enzim esensial serta inaktivasi fungsi dan materi genetik. Menurut Romanengko *et al.*, (2008) biosintesis senyawa antimikroba sangat berperan dalam proses pelekatan, kolonisasi target hingga terjadi kompetisi dalam mendapatkan ruang dan nutrisi antar mikroba.

Berdasarkan hasil uji antagonis semua isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu, menghasilkan diameter zona hambat yang berbeda-beda. Perbedaan ukuran diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri patogen *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* kemungkinan disebabkan oleh kandungan senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri dari usus ikan sapu-sapu ini berbeda-beda. Menurut Rastina *et al.*, (2015) kemampuan suatu antimikroba dalam menghambat mikroorganisme lain atau patogen tergantung pada jenis antimikroba yang dihasilkan.

Menurut Verschuere *et al.*, (2000) populasi mikroba dapat melepaskan substansi kimia yang memiliki kemampuan bakterisida atau bakteristatik yang dapat mempengaruhi populasi bakteri lain. Menurut Tambekar dan Bhutada (2010) kemampuan suatu bakteri mempengaruhi populasi bakteri lain karena agen antibakteri ini mampu menurunkan pH menjadi rendah sehingga bakteri patogen sulit untuk bertahan hidup. Hal ini sesuai dengan penelitian Susana (2017) bakteri heterotrofik yang diuji dengan bakteri patogen *V. alginolyticus*, *A. hydrophila* dan

Pseudomonas sp. membentuk hambatan yang menandakan bakteri tersebut menghasilkan produk antibiotik bakteriosin maupun asam organik tertentu.

Berdasarkan Tabel 4.1 dan Gambar 11 dapat dilihat bahwa rata-rata diameter zona hambat kontrol positif yang tertinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *V. alginolyticus*, yaitu sebesar 34,1 mm. Kontrol positif dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *A. hydrophila* sebesar 17 mm dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen *P. aeruginosa* sebesar 15,1 mm. Kontrol negatif untuk semua perlakuan tidak memiliki daya hambat, karena kertas cakram untuk kontrol negatif tidak diberi perlakuan sehingga tidak menghasilkan zona hambat.

Dilihat dari perbedaan rata-rata diameter zona hambat, pada kontrol positif menandakan bahwa, senyawa antibiotik oksitetrasiklin yang terkandung pada cakram kontrol positif juga memiliki kemampuan yang berbeda-beda untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Perbedaan kemampuan daya hambat ini disebabkan karena setiap bakteri patogen memiliki tingkat toleransi yang berbeda-beda dalam melawan senyawa antibakteri. Hal ini sesuai dengan pernyataan Damayanti *et al.*, (2019) setiap bakteri patogen memiliki tingkat resistensi yang berbeda terhadap antibakteri.

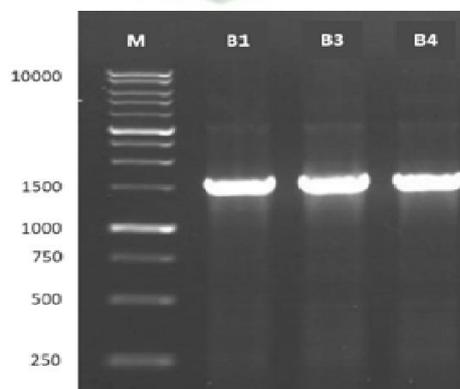
Antibiotik oksitetrasiklin adalah turunan dari antibiotik tetrasiklin, antibiotik oksitetrasiklin ini memiliki spektrum yang luas dengan sistem kerjanya yaitu mengganggu kemampuan bakteri atau patogen untuk menghasilkan protein esensial. Tanpa protein ini, bakteri atau patogen tidak dapat tumbuh, berkembangbiak dan bertambah jumlahnya, yang menyebabkan penyebaran bakteri atau patogen tersebut terhenti. Menurut Redvold *dalam* Nicolau (2003)

golongan tetrasiklin merupakan antibiotik dengan aktivitas tipe 3 atau aktivitas terapi tergantung waktu dan memiliki efek moderat yang presisten. Antibiotik oksitetrasiklin merupakan antibiotik yang dapat dengan mudah di distribusikan ke seluruh organ dan jaringan sehingga mampu menghambat bakteri atau patogen pada tingkat terkecil (Pradika *et al.*, 2019).

4.2. Analisis Sekuen dan Blast DNA Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu

Identifikasi bakteri dari usus ikan sapu-sapu menggunakan uji DNA hanya pada isolat B1, B3 dan B4 saja karena tiga isolat tersebut yang mempunyai daya hambat paling besar terhadap pertumbuhan bakteri patogen. Metode identifikasi 16S rDNA digunakan karena merupakan standar untuk mempelajari filogenetik atau hubungan kekerabatan dan keanekaragaman mikroorganisme. Menurut Benga *et al.*, (2014) metode 16S rDNA sangat akurat untuk mengidentifikasi bakteri. Kemudian Wang *et al.*, (2014) menyatakan identifikasi dengan metode 16S rDNA digunakan untuk menentukan distribusi spesies bakteri.

Hasil ekstraksi DNA bakteri yang berasal dari usus ikan sapu-sapu setelah dianalisis dengan PCR, kemudian dielektroforesis dengan menggunakan 1% *gel agarosa* untuk menunjukkan DNA total yang telah berhasil dimurnikan, untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 12 . Hasil Elektroforesis DNA Isolat Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu

Berdasarkan gambar diatas seluruh isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu dari uji PCR merupakan pita tunggal, besar ukuran PCR yang dihasilkan dapat dikatakan sudah sesuai dengan yang diharapkan dari gen 16S rDNA bakteri yaitu sebesar 1500 bp, hal ini sesuai dengan perbandingan menggunakan marker DNA. Amplifikasi isolat bakteri yang memiliki pita tunggal menunjukkan bahwa primer yang digunakan adalah primer spesifik untuk mengamplifikasi gen 16S rDNA pada bakteri. Setelah melakukan elektroforesis DNA tahap selanjutnya yaitu sekuensing yang dilakukan untuk mengurutkan basa nitrogen, pasangan basa kemudian digabungkan dan dirapikan dengan menggunakan software Bioedit7. Ada 4 basa nitrogen yang merupakan unit pembentuk DNA yaitu *adenine* (A), *thymine* (T), *guanine* (G) dan *cytosine* (C). Hasil urutan basa nitrogen isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu ini dapat dilihat pada Lampiran 6.

Data urutan basa nitrogen yang sudah diperoleh kemudian dimasukkan pada sitem BLAST (*Basic Local Aligment Search Tool*) melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> untuk mencari nama spesies isolat bakteri berdasarkan persentase homologi DNA, hasil sekuen dengan basis data yang sudah ada di *Genbank*. Hasil identifikasi isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu dilihat berdasarkan hasil BLAST dengan tingkat homologi yang tertinggi.

Tabel 4.2. Penelusuran Sekuen 16S rDNA Isolat Bakteri dari Usus Ikan Sapu-sapu dengan Sistem Blast

Isolat	Spesies	Strain	Kode Akses	Query Coverage (%)	Homology (%)
B1	<i>Bacillus paramycoides</i>	MCCC	NR157734.1	100	99,59
B3	<i>Bacillus</i> sp.	IC-1C2	MT649293.1	99	99,53
B4	<i>Bacillus megaterium</i>	MP-5	DQ462195.1	100	99,65

Sumber: Blast (2021)

Berdasarkan hasil penelusuran menggunakan sistem BLAST, isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu memiliki kemiripan DNA yaitu, isolat B1 dengan *Bacillus paramycoides*, isolat B3 dengan *Bacillus* sp. dan isolat B4 dengan *Bacillus megaterium*. Tingkat homologi isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu mulai dari 99,53 sampai 99,65% dengan jenis bakteri yang terdaftar di *Genbank*.

Isolat B1 memiliki homologi 99,59% dengan bakteri *Bacillus paramycoides* strain MCCC, isolat B3 memiliki homologi 99,53% dengan bakteri *Bacillus* sp. strain IC-1C2, isolat B4 memiliki homologi 99,65% dengan bakteri *Bacillus megaterium* strain MP-5. Tingkat homologi pada ketiga isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu B1, B3 dan B4 menunjukkan filogenetik atau kekerabatan sampai tingkat spesies karena tingkat homologinya mencapai 99%. Menurut Janda dan Abbott (2007) Jika tingkat homologi suatu isolat mencapai persentase mendekati 100% atau di atas 97% dapat dinyatakan sebagai spesies yang sama, namun jika tingkat homologinya kecil dari 97% kemungkinan isolat tersebut merupakan spesies baru. Hagstrom *et al.*, (2000) menyatakan jika tingkat homologinya lebih kecil dari 93% isolat bakteri tersebut kemungkinan spesies baru, sebab urutan basa nitrogennya belum terdaftar di *Genbank*.

Isolat yang mempunyai persamaan sekuen 16S rDNA lebih dari 97% dapat dikatakan mewakili sampai pada tingkat spesies yang sama, persamaan sekuen 16S rDNA antara 93-97% dapat mewakili sampai pada tingkat genus yang sama. Apabila dibawah 93% kemungkinan adalah spesies yang tidak sama dan urutan basa nitrogennya belum terdaftar di *Genbank* (Hangstrom *dalam* Lusiano, 2007).

Hasil homologi sekuen 16S rDNA dari isolat bakteri B1 mempunyai kemiripan homologi dengan *B. paramycoides* strain MCCC dengan tingkat

homologi sebesar 99,59%, ini berarti tingkat homologinya sama sampai tingkat spesies. *B. paramycooides* mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen karena merupakan bakteri gram positif yang memiliki dinding sel yang tebal, menghasilkan enterotoksin membentuk spora sehingga dapat bertahan hidup di tempat yang kondisinya buruk sekalipun dan menghasilkan enzim amilase dalam menghidrolisis amilum yang digunakan sebagai nutrisinya.

Bakteri *B. paramycooides* adalah bakteri gram positif yang berbentuk batang, memiliki lebar 0,8-1,2 μm dan 1,8-2,2 μm ., bentuk koloni seperti lilin, bundar, tidak tembus cahaya dan berdiameter 2-3 mm. Pertumbuhan terjadi pada suhu 15–39°C dengan suhu optimal hidupnya 30°C, dapat hidup pada pH 5–9 dan dapat optimal hidup pada pH 7. Dalam tes API 20E *B. paramycooides* positif untuk pemanfaatan sitrat, memproduksi asetoin (*Voges-Proskauer*), gelatinase dan produksi asam dari glukosa, sedangkan *B. paramycooides* negatif untuk b-galaktosidase, arginin dihidrolase, lisin dekarboksilase, ornitin dekarboksilase, memproduksi H₂S, urease, triptofan desaminase, produksi indole dan produksi asam dari mannitol, inositol, sorbitol, rhamnosa, sukrosa, melaminosa, amingdalin (Liu *et al.*, 2017).

Hasil homologi sekuen 16S rDNA dari isolat bakteri B3 mempunyai kemiripan homologi dengan *Bacillus* sp. strain IC-1C2 dengan tingkat homologi sebesar 99,53%, ini berarti tingkat homologinya sama sampai tingkat spesies. Bakteri dari genus *Bacillus* sering digunakan dalam penelitian yang berkaitan dengan probiotik, baik dalam bidang kesehatan, pertanian, perikanan dan lain-lain sebab mampu menghasilkan senyawa-senyawa antimikroba. Sesuai dengan pendapat Feliatra *et al.*, (2018) bakteri *Bacillus* sp. memiliki kemampuan

menghasilkan antibiotik, berperan dalam proses nitrifikasi dan denitrifikasi. *Bacillus* sp. dapat melakukan mineralisasi terhadap bahan organik kompleks berupa senyawa polisakarida, protein dan selulosa.

Setiaji *et al.*, (2019) menyatakan Spesies *Bacillus* sp. memiliki kemampuan sebagai probiotik, sehingga dapat dimanfaatkan dalam berbagai kebutuhan pada kegiatan budidaya. Nishijima *et al.*, (2005) mengemukakan bahwa spesies *Bacillus* menghasilkan sekurang-kurangnya sekitar 66 jenis antibiotik dan strain tertentu yang merupakan agen biokontrol. Effendi (2017) menyatakan bahwa bakteri probiotik dapat menghasilkan senyawa-senyawa antimikroba yang mampu menekan pertumbuhan mikroba patogen.

Hasil homologi sekuen 16S rDNA dari isolat bakteri B4 mempunyai kemiripan homologi dengan *B. megaterium* strain MP-5 dengan tingkat homologi sebesar 99,65%, ini berarti tingkat homologinya sama sampai tingkat spesies.

Bakteri *B. megaterium* adalah bakteri pembentuk spora yang berbentuk seperti batang, gram positif dan banyak ditemukan di habitat yang sangat beragam. Dengan panjang sel hingga 4 μm dan diameter 1,5 μm , *B. megaterium* adalah salah satu bakteri terbesar yang ditemukan. Sel bakteri ini sering ditemukan berpasangan dan berantai, *B. megaterium* merupakan kelompok mikroba yang menguntungkan karena dapat berguna sebagai probiotik. Sesuai pendapat Hadieotomo (1985) bakteri *B. megaterium* adalah organisme yang berbentuk batang, gram positif, dapat menghasilkan endospora, katalase positif, aerobik, nitrit negatif dan VP negatif.

Menurut Madigan (2000) bakteri ini memiliki ciri-ciri spora oval/silindris, fakultatif anaerob, menghidrolisis gula dan kasein, dinding spora relatif tipis. *B.*

megaterium merupakan golongan Eubacteria terbesar yang ditemukan di tanah dan mampu bertahan dalam kondisi lingkungan yang ekstrim. *B. megaterium* menghasilkan enzim penisilin amidase yang digunakan dalam pembuatan penisilin. Belma *et al.*, (2000) menyatakan *B. megaterium* termasuk golongan bakteri mesofilik yaitu bakteri yang dapat bertahan hidup pada pH berkisar antara 5,5-8. Selain itu, *B. megaterium* dapat tumbuh pada suhu 30-37°C.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Hasil uji antagonis 5 isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* dengan respon daya hambat pada kategori sedang dan kuat. Daya hambat yang tertinggi terhadap pertumbuhan bakteri patogen adalah pada isolat B4 dengan kategori kuat.
2. Hasil identifikasi menggunakan 16S rDNA diperoleh 3 isolat bakteri dari usus ikan sapu-sapu, yaitu isolat B1 (*Bacillus paramycooides* strain MCCC), B3 (*Bacillus* sp. strain IC-1C2) dan B4 (*Bacillus megaterium* strain MP-5).

5.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap bakteri dari usus ikan sapu-sapu sebagai kandidat probiotik.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, U.F. 2006. Imunisasi Mengapa Perlu?. Jakarta. Kompas Media Nusantara.
- Afrianto dan E. Liviawaty. 2005. Pakan Ikan dan Perkembangannya. Kanisius. Yogyakarta.
- Anonim. 2010. Media Pertumbuhan Mikroorganismenya. <http://mikrobiologi.praktik.com/media-pertumbuhan-mikroorganismenya-2/>. Diakses tanggal 07 Oktober 2020.
- _____. 1997. Dasar-Dasar Pemeriksaan Mikrobiologi. Jilid II. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 110-114 p.
- Aryanti, D.L. 2017. Pengenceran dan Penanaman Mikroba. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Jambi. 3 Hal
- Barrow, G.I. dan R.K.A. Feltham. 1993. Cowan and Steel's Manual for The Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Bauman, W.R. 2001. Microbiology with Disease by Taxonomy 3th Edition. Pearson. San Fransisco.
- Benga, L., W.P.M. Benten, E. Engelhardt, K. Kohrer, C. Gougoula and M. Sager. 2014. 16S Ribosomal DNA Sequence-based Identification of Bacteria in Laboratory Rodents: A Practical Approach in Laboratory Animal Bacteriology Diagnostics. Laboratory Animals. 48 (4): 305-312 p.
- Bergey's. 1994. Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition. A Mawerly Company.
- Bhagawati, D., M.N. Abulias dan A. Amurwanto. 2013. Fauna Ikan Siluriformes dari Sungai Serayu Banjarnegara dan Tajum di Kabupaten Banyumas. Jurnal MIPA. 36 (2): 112-122.
- Chaicana, R. dan S. Jongphadungkiet. 2012. Assesment of The Invasive Catfish *Pterygoplichthys pardalis* (Castelneu, 1855) in Thailand: Ecological Impacts and Biological Control Alternatives. Tropical Zoology. Vol. 25 (4): 173-182 p.
- Damayanti, S., R. Kusdarwati and H. Suprpto. 2019. Bacterial Resistance of *Escherichia coli* Against Antibiotics in *Clarias batrachus* Digestion. AACL Bioflux. 12(6): 2195-2201 p.
- Davis dan Stout. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. Journal of Microbiology.
- Dwijoseputro, 1987. Dasar-dasar Mikrobiologi. Djambatan. Jakarta.

- Effendi, I. 2017. Probiotik dan Industri Perikanan. Unilak Press. 171 Hal.
- Elfidasari, D., F.D. Qoyyimah, M.R. Fahmi dan R.L. Puspitasari. 2016. Variasi Ikan Sapu-sapu (*Loricariidae*) Berdasarkan Karakter Morfologi di Perairan Ciliwung. Jurnal Al-Azhar Indonesia. Vol. 3 (4): 221-225 p.
- Fadil, M.S., I.J. Syaifullah dan Zakaria. 2011. Kajian Beberapa Aspek Fisika Kimia Air dan Aspek Fisiologis Ikan yang Ditemukan pada Aliran Buangan Pabrik Karet di Sungai Batang Arau. Tesis Pasca Sarjana Biologi Universitas Andalas. Padang.
- Fardiaz, S. 1989. Petunjuk Laboratorium. Analisis Mikrobiologi Pangan. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Direktorat Jenderal Peerguruan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Institut Pertanian Bogor.
- Feliatra, Z.A. Muchlisin, H.Y. Teruna, W.R. Utamy, Nursyirwani and A. Dahliaty. 2018. Potential of Bacteriocins Produced by Probiotic Bacteria Isolated from Tiger Shrimp and Prawns as Antibacterial to *Vibrio*, *Pseudomonas* and *Aeromonas* Species on Fish. F1000 Research. 7(415): 1-18 p.
- Feliatra. 1999. Penyakit yang Disebabkan Oleh Bakteri. Diakses tanggal 08 Oktober 2020.
- Firnanda, R., Sugito, Fakhurrazi dan D.V.S Ambarwati. 2013. Isolasi *Aeromonas hydrophila* pada Sisik Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Diberi Tepung Daun Jaloh (*Salix tetrasperma* Robx). Jurnal Medika Veterinaria. Vol. 7 (1): 22-24 p.
- Fuller, R. 1987. A Review, Probiotics in Man and Animals. Journal of Applied Bacteriology 66: 365-378 p.
- Ginting, S., D. Suryanto dan Desrita. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Potensial Probiotik pada Saluran Pencernaan Ikan Bandeng (*Chanos chanos*). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sumatera Utara. Medan. 7 p.
- Hagstrom. A., J.F. Pinhassi and U.L. Zweiefel. 2000. Biogeographycal Diversity Among Marine Bacterioplankton. Aquatic Microbial Technology. 21: 231-244 p.
- Hardalo, C. dan S.C. Edberg. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of Risk From Drinking Water. Crit Rev Microbiology. Vol. 23 (1): 47-75 p.
- Harley dan Presscot. 2002. Laboratory Exercise in Microbiology. USA. Mc Graw Hill Publisher. 116 Hal.
- Haryani, A., G. Roffi, D.B. Ibnu dan S. Ayi. 2012. Uji Efektivitas Daun Papaya (*Carica papaya*) untuk Pengobatan Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Mas Koki (*Carassius auratus*). Jurnal Perikanan dan Kelautan. Vol. 3 (3): 213-220 p.

- Hidayat, Y. dan Sutarma. 1999. Teknik Pembuatan Kultur Media Bakteri. Lokakarya Fungsional Non Peneliti. Vol. 1(1) : 149-155 p.
- Hill, A.M., D.M. Lodge. 1999. Replacement of Resident Crayfishes By An Exotic Crayfish: The Roles of Competition and Predation. Ecol. App. Vol. 9 (2): 678-690 p.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams. 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition. Lippincott Williams dan Wilkins. Philadelphia. USA. 347, 559 p.
- Hoover, J.J., K.J. Killgore and A.F. Confrancesco. 2004. Suckermouth Catfished: Threats to Aquatic Ecosystems of The United States Aquatic Nuisance Species Research Program ANSRP Bulletin. Vol. 4 (1): 73-79 p.
- Iqbalali. 2008. <http://iqbalali.com/Pertumbuhan-Bakteri-dan-Suhu.mht>. Diakses tanggal 19 Oktober 2020.
- Irianto, A. 2003. Probiotik Akuakultur. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 125 p.
- Janda, J.M. and S.M. Abbott. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in The Diagnostic Laboratory: Pulse, Perils and Pitfalls. Journal of Clinical Microbiology. 30 (1): 3217-3219 p.
- Junianto, H.K. dan I. Maulina. 2007. Pengaruh Meniran dalam Pakan untuk Mencegah Infeksi Bakteri *Aeromonas sp.* pada Benih Ikan Mas (*Carpinus carpio*). Journal of Tropical Fisheries. Vol. 1 (2): 145-150 p.
- Kismiyati. 2009. Ektoparasit *Argulus japonicus* (Crustacea: Argulidae) pada Ikan Maskoki *Carassius auratus* (Cypriniformes: Cyprinidae) dan Upaya Pengendalian dengan ikan Sumatera *Puntius tetrazone* (Cypriniformes: Cyprinidae). Disertasi. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga. 128 p.
- Kottelatt, M.T., S.N. Whitten, Kartikasari dan S. Wirjoatmodjo. 1993. Freshwater fishes of Western Indonesia & Sulawesi. Periplus Edition. EMDI Project.
- Kusdarwati, R. dan Sudarno. 2011. Petunjuk Pratikum Analisis Penyakit Ikan I. Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kusnadi, P., A. Syulasma, W. Purwianingsih dan Diana. 2003. Mikrobiologi. Jurusan Pendidikan Biologi. FPMIPA-UPI. IMSTEP.
- Kusunoki, W.A.T., R.R. Carus dan A.E. Del-Angel. 2007. Amazon Sailfin Catfish, *Pterygoplichthys pardalis* (Loricariidae), Another Exotic Species Established In Southeastern Mexico. The Southwestern Naturalist. Vol. 52.
- Liu, Y., Q. Lai, J. Du and Z. Shao. 2017. Genetic Diversity and Population Structure of The *Bacillus cereus* Group Bacteria from Diverse Marine Environments. Scientific Reports. 7(689): 1-7 p.

- Lukistyowati, I. dan Kurniasih. 2012. Pelacakan Gen Aerolysin dari *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Mas yang Diberi Pakan Ekstrak Bawang Putih. *Jurnal Veteriner*. Vol. 13 (1 : 43-50 p.
- Lusiano, A. 2007. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Hidro Karbono Klastik dengan Sekuens 16S rDNA dari Sedimen Perairan Dumai. [Skripsi]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko dan J. Parker. 2009. *Biology of Microorganism*. 12th ed. New York. Prentice Hall International.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko and T.D. Brock. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*. New Jersey: Pearson Prentice Hall.
- Mallet J. 2007. Hybrid Speciation. *Nature*. 446 : 279-283 p.
- Mangunwardoyo, W., R. Ismayasari dan E. Riani. 2010. Uji Patogenisitas dan Virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) Melalui Postulat Koch. *J. Ris. Akuakultur*. 5 : 245-255 p.
- Manin, F., E. Hendalia dan Yusrizal. 2012. Potensi Bakteri Bacillus dan Lactobacillus sebagai Probiotik untuk Mengurangi Pencemaran Amonia pada Kandang Unggas. *Jurnal Peternakan Indonesia*, 14 (2).
- Mari, M. dan M. Guizzardi. 1998. The Postharvest Phase: Emerging Technologies Forthe Control of Fungal Diseases. *J. Phytoparastica*. Vol. 26 (1): 59-66 p.
- Maria, P.D. 2002. Eksplorasi dan Uji Antagonisme Bakteri Rhizosfer Tanah dan Endofit Akar untuk Pengendalian Penyakit Layu (*Fusarium oxysporum* f.sp. cubense) Pada Pisang (*Musa paradisiaca*). Skripsi. HPT. Fakultas Pertanian. IPB.
- Nasahi, H.C. 2010. Peran Mikroba dalam Pertanian Organik. Tesis. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Nico, L.G., P.L. Butt, G.R. Johnston, H.L. Jelks, M. Kail dan S.J. Walsh. 2012. Discovery of South American Suckermouth Amored Catfish (*Loricariidae*, *Pterygoplichthys* spp.) in The Santa Fe River Drainage, Suwannee River Basin, USA. *Bioinv Rec*. 1(3): 179-200 p.
- Nico, L.G. dan R.T. Martin. 2001. The South American Armored Catfish, *Pterygoplichthys anisitsi* (Pisces: *Loricariidae*), in Teas, With Comment on Foreign Fish Introduction in The American Southwest. *The Southwestern Naturalist*. 46(1): 98-104 p.
- Nicolau, D. P. 2003. Optimizing Outcomes with Antimicrobial Therapy Through Pharmacodynamic Profiling. *J. Infect. Chemother*. 9(4): 292-296 p.
- Nishijima, T., K. Toyota and M. Mochizuki. 2005. Predominant Culturable Bacillus species in Japanese Arable Soils and Their Potential as Biocontrol Agents. *Microbes and Environments*. 20(1): 61-68 p.

- Olga, R.K., J. Rini, A. Akbar, Isnansetyo dan L. Sembiring. 2007. Protein *Aeromonas hydrophila* Sebagai Vaksin untuk Pengendalian MAS (Motile *Aeromonas septicemia*) pada Jambal Siam (*Pangasius hypophthalmus*). Jurnal Perikanan. 9(1): 17-25 p.
- Ozedilek, S.Y. 2007. Possible Therats for Middle East Inland Water; An Exotic Species, *Pterygoplichthys disjunctivus*. in Asi River, Turkey (Pisces: *Loricariidae*). Journal of Fisheries and Aquatic Science. 24 : 303-306 p.
- Page, L.M. dan R.H. Robins. 2006. Identification of Sailfin Catfishes (Teleostei: *Loricariidae*) in Southeastern Asia. The Raffles Bulletin of Zoology. 54 (2): 455-457 p.
- Pan, X., F. Chen, T. Wu, H. Tang and Z. Zhou. 2009. The Acid, Bile Tolerance and Antimicrobial Property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. J. Food Control. 20 : 598-602 p.
- Panase, P. dan P. Intawicha. 2018. Partial Replacement of Commercial Fish Meal with Amazon Sailfin Catfish *Pterygoplichthys pardalis* Meal in Diets for Juvenile Mekong Giant Catfish *Pangasianodon gigas*. Aquaculture Report. 12 : 25-29 p.
- Pelczar, M.J. 1986. Dasar-Dasar Mikrobiologi. UI Press. Jakarta.
- Pelczar, M.J. dan E.C.S. Chan. 2005. Dasar-dasar Mikrobiologi 1. Alih Bahasa: Hadioetomo, R. S., T. Imas, S.S. Tjitrosomo dan S.L. Angka. UI Press, Jakarta.
- _____. 1989. Dasar-Dasar Mikrobiologi. UI Press. Jakarta.
- Pradika, A.Y., S. Chusniati, M. T. E. Purnama, M. H. Effendi, A. Yudhana, P. A. Wibawati. 2019. Uji Total *Escherichia coli* pada Susu Sapi Segar di Koperasi Peternak Sapi Perah (KPSP) Karyo Ngremboko Kecamatan Purwoharjo Kabupaten Banyuwangi. J. Med. Vet. 2 (1): 1-6 p.
- Prihardhyanto A. 1995. Beberapa Aspek Biologi Ikan Sapu-sapu (*Hypostomus* sp dan *Hyposarcus pardalis*), Suatu Tinjauan Ringkas. Depok: Fakultas Matematika dan IPA, Universitas Indonesia. 17 p.
- Rahmiati. 2017. Eksplorasi Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik dan Potensinya dalam Menghambat Bakteri Patogen. Fakultas Biologi. Universitas Medan Area. Medan. Sumatera Utara.
- Rastina, M., Sudarwanto dan I. Wientarsih. 2015. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kari (*Murraya koenigii*) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Ascherichia coli* dan *Pseudomonas* sp. Jurnal Kedokteran Hewan. 9(2): 185-188 p.
- Reneshwary, C., M. Rajalakshmi, K. Marimuthu dan R. Xavier. 2011. Dietary Administration of *Bacillus thuringiensis* on The Cellular Innate Immune Response of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Against *Aeromonas*

- hydrophila*. Department of Biotechnology, Faculty of Applied Sciences AIMST University. Kedah Darul Aman, Malaysia. 15 : 53-60 p.
- Riyanto, S. 2006. Distribusi Jenis Ikan dan Kualitas Perairan di Bengawan Solo. <http://jurnal.pdii.lipi.go.id>. Diakses tanggal 10 Oktober 2020.
- Romanengko, L.A., T. Naoto, U. Masataka, I.K. Natalia and V.M. Valery. 2008. Diversity and Antagonistic Activity of Sea Ice Bacteria Isolated from The Sea of Japan. *Microbes and Environmental*. 23(3): 209-214 p.
- Rosidah dan M.A. Wila. 2012. Potensi Ekstrak Daun Jambu Biji Sebagai Antibacterial untuk Menanggulangi Serangan Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Gurame (*Osphronemus gourami* Lacepede). *Jurnal Akuatika*. 3 (1): 19-27 p.
- Salminen, S., A. Ouwehand, Y. Benno dan Y.K. Lee. 1999. Probiotics: How Should Be Defined? *Trends in Food Science and Technology* 10:107–110 p.
- Sari, Y.N.M., S. Syukur dan Jamsari. 2013. Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi DNA Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Berpotensi Sebagai Antimikroba dari Fermentasi Markisa Kuning (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*). *Jurnal Kimia Unand*. 2 (2): 81-91 p.
- Setiaji, J., F. Feliatra, H.Y. Teruna and I. Lukistyowati. 2019. Antimicrobial Agents Derived from Heterotrophic Bacteria Against Pathogenic Bacteria. *IOP Conference Series, Earth and Environmental Science*. 3448: 012029.
- Sornplang, P. dan P. Sudthidol. 2016. Probiotic Isolates from Unconventional Sources. *Journal of Animal Science and Technology*. 58-26 p.
- Spira, R., M. William, S. Bradley dan J.L. Froehlich. 1981. Simple Adult Rabbit Model for *Vibrio cholerae* and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Diarrhea. *Division of Geographic Medicine*. Johns Hopkins University. Maryland. Vol. 32 (2): 739-747 p.
- Surnesih. 2000. Pengembangan Diversifikasi Produk Tradisional Otak-otak dari Ikan Sapu-sapu (*Hyposarcus pardilis*). [:http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/16791/C01sur.pdf?sequence=1](http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/16791/C01sur.pdf?sequence=1). Diakses tanggal 01November 2020.
- Suryanto, D. 2004. Mengenal Lintasan Aerobik Degradasi Senyawa Hidrokarbon Aromatik Monosiklik Mikroorganisme. *Wartauniversitaria*. Vol. 18 (19) : 92-94 p.
- Susana. M. 2017. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Heterotrofik pada Perairan Laut Kawasan Pemukiman dan Perairan Bersalininitas Rendah di Kelurahan Purnama Dumai Provinsi Riau. [Skripsi]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Riau. Pekanbaru.

- Susaty, I. D. 2006. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Geltinolitik Asal Tambak Daerah Gresik dan Lamongan. Skripsi. Program Studi S1. Budidaya Perairan Universitas Airlangga. Surabaya. 6-7 p.
- Tuju, M.J. 2004. Antagonisme *Trichoderma* spp, to *Raistonia solanacearum* Cause of Wilt Bacteria in Potato Plant. Eugenia. Vol. 10 (2) : 143-155 p.
- Verschere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos dan W. Verstraete. 2000. Probiotic Bacteria As Biological Control Agents in Aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Review 64: 655-671 p.
- Volk, W.A. dan M.F. Wheeler. 1993. Mikrobiologi Dasar. Edisi Kelima. Jilid I. Erlangga. Jakarta.
- Wang, H., P. Du, J. Li, Y. Zhang, N. Han, P.CY. Woo and C. Chen. 2014. Comparative Analysis of Microbiome Between Accurately Identified 16S rDNA and Quantified Bacteria in Simulated Samples. Journal of Medical Microbiology. 63: 433-440 p.
- Watson, K, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L. 2008. Probiotics in Aquaculture: The Need, Principles and Mechanisms of Action and Screening Processes. *Aquaculture*, Vol. 274. (1): 1-14 p.
- Wiyaguna, D. 2010. Analisis Histologi Ginjal dan Insang Ikan Sapu-sapu (*Hipostomus plecostomus*) pada Beberapa Tempat di Batang Harau yang Berdekatan dengan Pabrik Karet di Banuarang. Universitas Andalas. Padang.
- Wiyanto, D.B. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* dan *Eucheuma denticullatum* Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio harveyii*. Jurnal Kelautan. Vol. 3 (1).
- Yulvizar, C., I. Dewiyanti dan C.N. Defira. 2014. Seleksi Bakteri Berpotensi Probiotik dari Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Indegenous Jantho Berdasarkan Aktivitas Antibakteri Secara In Vitro. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Universitas Syiah Kuala, Darussalam.
- Zulkifli. 2001. Digestive Protase Capacity in Fish in Relation to Species, Body Size, Growth and Dietary Compositions. A Thesis Submitted for The Degree of Doctor of Phylosophy to Departement of Biologycal Science. Heriot Watt Universiity Edinburgh. 6 : 96- 107 p.