

**PENGARUH PERBEDAAN KONSENTRASI SUPERNATAN *Vibrio probioticus*  
SEBAGAI INHIBITOR TERHADAP *Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO**

**SKRIPSI**

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh:

**IKA DWI KARTIKA NINGTYAS**

**NIM. 0610850037**



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN**

**MALANG**

**2011**

**PENGARUH PERBEDAAN KONSENTRASI SUPERNATAN *Vibrio probioticus*  
SEBAGAI INHIBITOR TERHADAP *Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO**

***Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat untuk  
Memperoleh Gelar Sarjana pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya***

**Oleh:**

**IKA DWI KARTIKA NINGTYAS**

**NIM. 0610850037**



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
MALANG  
2011**

**PENGARUH PERBEDAAN KONSENTRASI SUPERNATAN *Vibrio probioticus*  
SEBAGAI INHIBITOR TERHADAP *Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO**

***Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat untuk  
Memperoleh Gelar Sarjana pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya***

Oleh :

**IKA DWI KARTIKA NINGTYAS**

**NIM. 0610850037**

**DOSEN PENGUJI I**

**(Dr. Ir. MAFTUCH, MSi)**

**NIP. 19660825 199203 1 001**

**TANGGAL :**

**DOSEN PENGUJI II**

**(ATING YUNIARTI, SPi. M.Aqua)**

**NIP. 19750604 199903 2 002**

**TANGGAL :**

**MENYETUJUI,**

**DOSEN PEMBIMBING I**

**(Ir. MOHAMAD FADJAR, MSc)**

**NIP. 19621014 198701 1 001**

**TANGGAL :**

**DOSEN PEMBIMBING II**

**(Dr. Ir. SRI ANDAYANI, MS)**

**NIP. 19611106 198602 2 001**

**TANGGAL :**

**MENGETAHUI,  
KETUA JURUSAN**

**Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, MS**

**NIP. 19600322 198601 1 001**

**TANGGAL :**

## RINGKASAN

**IKA DWI KARTIKA NINGTYAS.** Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Supernatan *Vibrio probioticus* Sebagai Inhibitor Terhadap *Vibrio harveyi* Secara In Vitro (Di bawah bimbingan Ir. **MOHAMAD FADJAR, MSc.** dan **Dr. Ir. SRI ANDAYANI, MS**).

Bakteri patogen merupakan bakteri yang memiliki kemampuan untuk menimbulkan penyakit. Penyakit merupakan suatu keadaan dimana suatu organisme tidak dapat mempertahankan keadaan normal karena adanya gangguan fungsi fisiologis yang dapat disebabkan oleh organisme patogen. *Vibrio harveyi* adalah bakteri patogen yang dapat menyebabkan penyakit *Vibriosis (luminescent vibriosis)*. Metode yang biasanya sering digunakan dalam pengendalian bakteri patogen dilakukan dengan cara pemberian terapi antibiotik. Namun, untuk menghindari adanya resistensi terhadap antibiotik, penanggulangan penyakit dapat dilakukan dengan cara memanfaatkan bakteri lain yang bersifat antagonis terhadap bakteri patogen. *Vibrio probioticus* adalah salah satu bakteri yang mempunyai sifat antagonis sehingga dapat digunakan sebagai kandidat probiotik yang dapat menghambat bakteri *V. harveyi* yang bersifat patogen. *V. probioticus* dikultur dan dibuat menjadi supernatan dan pemberian supernatan *V. probioticus* tersebut diharapkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah pemberian supernatan *V. probioticus* dengan konsentrasi yang berbeda mampu memberikan pengaruh terhadap aktivitas penghambatan bakteri *V. harveyi*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomedik, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan November 2010 sampai dengan Desember 2010.

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil yang dapat menegaskan hubungan antar variabel atau parameter yang diamati. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan, satu kontrol, dan tiga kali ulangan. Perlakuan yang digunakan pada penelitian ini adalah perbedaan konsentrasi supernatan *V. probioticus* yakni A (12,5 %), B (25 %), C (37,5 %), D (50 %) dan K (0 %).

Hasil penelitian menunjukkan efektivitas supernatan *V. probioticus* tertinggi pada konsentrasi 37,5 % yaitu sebesar 8,833 mm, kemudian konsentrasi 25 % sebesar 8,5 mm, konsentrasi 50 % sebesar 7,833 mm, dilanjutkan konsentrasi 12,5% sebesar 6,5 mm dan perlakuan terendah pada kontrol (0 %) yaitu sebesar 6 mm. Hasil perhitungan sidik ragam dapat dilihat bahwa penggunaan perbedaan konsentrasi supernatan *V. probioticus* tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap aktivitas penghambatan terhadap bakteri *V. harveyi*. Namun didapatkan konsentrasi terbaik yang dapat menghambat *V. harveyi* adalah sebesar 37,5 %.

Berdasarkan hasil penelitian dapat di sarankan perlu dilakukan penelitian lanjutan ujiantang *V. probioticus* dengan konsentrasi yang lebih kecil dan juga penelitian aktivitas penghambatan *V. harveyi* dengan supernatan *V. probioticus* secara *In vivo* terhadap organisme yang terserang *V. harveyi*.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga Skripsi yang berjudul “Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Supernatan *Vibrio probioticus* Sebagai Inhibitor Terhadap *Vibrio Harveyi* Secara In Vitro “ ini dapat diselesaikan.

Dengan selesainya laporan ini penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ayah dan Ibu yang telah mendukung saya dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
2. Bapak Ir. Mohamad Fadjar, MSc., selaku Dosen Pembimbing I.
  1. Ibu Dr. Ir. Sri Andayani, MS., selaku Dosen Pembimbing II.
3. Bapak Ir. Maftuch, MSi selaku Dosen Penguji I.
4. Ibu Ating Yuniarti, SPi, M.Aqua selaku Dosen Penguji II.
5. Bapak dan Ibu Dosen khususnya dari program studi Budidaya Perairan dan seluruh Dosen di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada umumnya.

Malang, Februari 2011

Penulis

## DAFTAR ISI

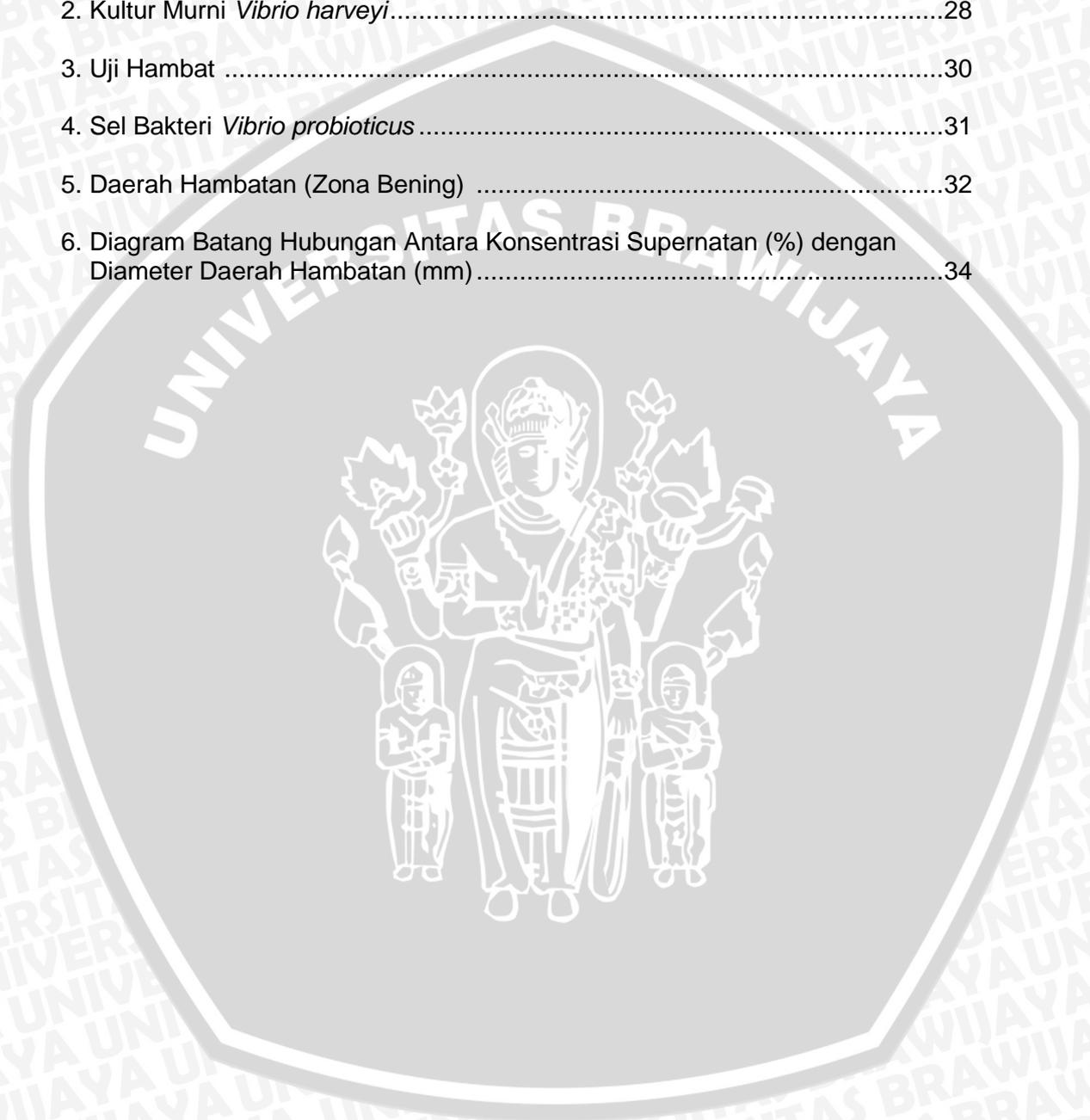
	Halaman
<b>RINGKASAN</b> .....	i
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	ii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	iii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	v
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	vii
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Kegunaan Penelitian .....	5
1.5 Hipotesis .....	5
1.6 Tempat dan Waktu .....	5
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1 Biologi <i>Vibrio harveyi</i> .....	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi .....	6
2.1.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan .....	7
2.1.3 Habitat .....	8
2.1.4 Infeksi dan Tanda-tanda Penyerangan .....	8
2.2 <i>Vibrio probioticus</i> .....	9
2.3 Ujiantang Supernatan <i>Vibrio probioticus</i> Terhadap <i>Vibrio harveyi</i> dengan Menggunakan <i>Well Diffusion Method</i> (Metode Difusi Sumuran) .....	12
<b>3. MATERI DAN METODE PENELITIAN</b> .....	15
3.1 Materi Penelitian .....	15
3.1.1 Alat-alat Penelitian .....	15
3.1.2 Bahan-bahan Penelitian .....	16
3.2 Metode Penelitian .....	16
3.3 Rancangan Percobaan .....	16
3.4 Persiapan Bakteri <i>Vibrio probioticus</i> .....	18
3.4.1 Persiapan Sampel .....	18
3.4.2 Isolasi Bakteri .....	19
3.4.3 Identifikasi Bakteri .....	19
3.4.4 Uji Penghambatan .....	19
3.4.5 Analisis Spesies Bakteri Menggunakan 16s rDNA .....	20
3.4.6 16s rDNA .....	20
3.5 Prosedur Penelitian .....	21
3.5.1 Persiapan Penelitian .....	21
3.5.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan .....	21
3.5.1.2 Pembuatan Media .....	22
3.5.2 Pelaksanaan Penelitian .....	24
3.5.2.1 Pembuatan Biakan Bakteri <i>Vibrio harveyi</i> .....	24

3.5.2.2 Pewarnaan Gram ( <i>Gram Staining</i> ) .....	24
3.5.2.3 Persiapan Bakteri Uji ( <i>Vibrio probioticus</i> ) .....	25
3.5.2.4 Pembuatan Supernatan <i>Vibrio probioticus</i> .....	25
3.5.3 Uji Tantang Supernatan <i>Vibrio probioticus</i> terhadap <i>Vibrio harveyi</i> .....	26
3.6 Parameter Uji .....	26
3.6.1 Parameter Utama.....	26
3.6.2 Parameter Penunjang .....	26
3.7 Analisa Data .....	26
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	28
4.1 Hasil Kultur <i>Vibrio harveyi</i> .....	28
4.2 Hasil Identifikasi Bakteri <i>Vibrio probioticus</i> .....	29
4.3 Penentuan Konsentrasi Supernatan <i>Vibrio probioticus</i> untuk Uji Tantang .....	31
4.4 Diameter Daerah Hambat Supernatan <i>Vibrio probioticus</i> Pada <i>Vibrio harveyi</i> Menggunakan <i>Well Diffusion Method</i> (Metode Difusi Sumuran) .....	32
4.5 Parameter penunjang .....	37
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	39
5.1 Kesimpulan .....	39
5.2 Saran .....	39
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	40
<b>LAMPIRAN</b> .....	43



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Denah Percobaan .....	18
2. Kultur Murni <i>Vibrio harveyi</i> .....	28
3. Uji Hambat .....	30
4. Sel Bakteri <i>Vibrio probioticus</i> .....	31
5. Daerah Hambatan (Zona Bening) .....	32
6. Diagram Batang Hubungan Antara Konsentrasi Supernatan (%) dengan Diameter Daerah Hambatan (mm).....	34



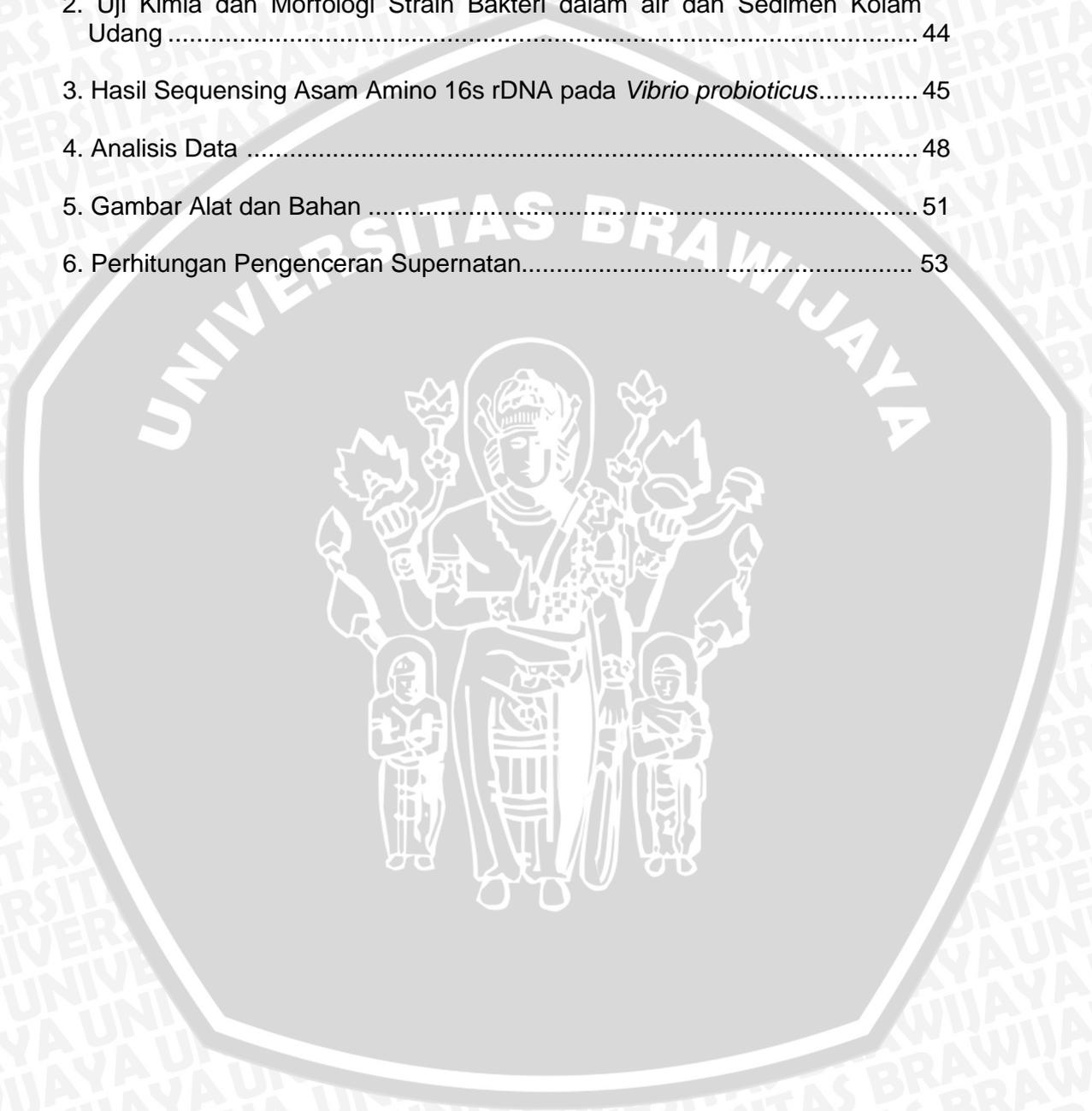
## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Diameter Daerah Hambatan Pada Bakteri <i>Vibrio harveyi</i> .....	33
2. Analisis Keragaman/Sidik Ragam Bakteri <i>Vibrio probioticus</i> Pada Pertumbuhan <i>Vibrio harveyi</i> .....	36



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Identifikasi <i>Vibrio harveyi</i> .....	43
2. Uji Kimia dan Morfologi Strain Bakteri dalam air dan Sedimen Kolam Udang .....	44
3. Hasil Sequensing Asam Amino 16s rDNA pada <i>Vibrio probioticus</i> .....	45
4. Analisis Data .....	48
5. Gambar Alat dan Bahan .....	51
6. Perhitungan Pengenceran Supernatan.....	53



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Kemajuan teknologi budidaya perikanan pada satu sisi dapat meningkatkan produksi sektor perikanan. Namun disisi lain, dengan adanya padat tebar yang tinggi serta pemberian pakan yang berlebihan, menyebabkan pergeseran keseimbangan antara lingkungan, ikan atau udang yang dipelihara dan patogen penyebab penyakit. Pergeseran keseimbangan ini menyebabkan stres pada ikan atau udang, sehingga pertahanan diri yang dimilikinya menjadi lemah dan akhirnya terserang oleh penyakit. Menurut Handajani dan Samsundari (2005), penyakit merupakan suatu keadaan dimana suatu organisme tidak dapat mempertahankan keadaan normal karena adanya gangguan fungsi fisiologis yang dapat disebabkan oleh organisme patogen maupun faktor-faktor lainnya. Dengan demikian timbulnya serangan penyakit pada udang dapat disebabkan oleh organisme lain, pakan maupun keadaan lingkungan. Organisme patogen penyebab timbulnya penyakit pada usaha budidaya diantaranya adalah golongan bakteri.

Bakteri patogen merupakan bakteri yang memiliki kemampuan untuk menimbulkan penyakit (Pelczar dan Chan, 1988). Salah satu bakteri yang bersifat patogen adalah *Vibrio harveyi* penyebab penyakit *Vibriosis (luminescent vibriosis)* atau yang dikenal dengan penyakit kunang-kunang. Penyakit ini bersifat akut dan ganas karena dapat memusnahkan populasi hewan budidaya dalam tempo 1-3 hari sejak adanya gejala awal yang tampak. Menurut (Agung, 2007), bakteri *V. harveyi* dapat berperan sebagai patogen primer maupun patogen sekunder. Sebagai patogen primer apabila *V. harveyi* masuk melalui kontak langsung dengan organisme dan sebagai patogen sekunder apabila *V. harveyi* tersebut menginfeksi organisme yang telah terlebih dahulu terinfeksi oleh penyakit lain. *V. harveyi* umumnya bersifat patogen oportunistik pada infeksi sekunder atau dapat juga bersifat patogen sejati penyebab penyakit. Penyakit udang menyala ini pada

umumnya menyerang udang pada stadia *mysis* sampai awal pasca larva Taslihan (1988) dalam Agung (2007).

Metode yang biasanya sering digunakan dalam pengendalian bakteri patogen dilakukan dengan cara pemberian terapi antibiotik. Akan tetapi penggunaan antibiotik dengan dosis dan waktu terapi yang tidak tepat dapat menimbulkan masalah tersendiri yaitu dapat mengakibatkan kelainan (*deformities*) pada larva udang dan juga berakibat berkembangnya resistensi bakteri terhadap obat (Rukyani, 1999). Selain itu, dampak negatif yang ditimbulkan dalam perairan budidaya dapat mencemari lingkungan yang menyebabkan kematian pada hewan budidaya. Untuk menghindari dampak tersebut, penanggulangan penyakit dapat dilakukan dengan cara memanfaatkan bakteri lain yang bersifat nonpatogen. Bakteri ini dapat menghasilkan zat antibakteri yang dapat menghambat atau membunuh bakteri lain, dalam hal ini adalah bakteri patogen (*V. harveyi*). Menurut Burgess *et al.*, (1991) dalam Uzair *et al.*, (2008), bakteri yang mempunyai zat antibakteri telah terbukti menghasilkan metabolit sekunder yang dapat menampilkan sifat antibakteri. Salah satu contohnya adalah bakteri *V. probioticus* yang aktif terhadap berbagai macam bakteri yang relatif. *V. probioticus* dikultur dan dibuat menjadi supernatan. Supernatan inilah yang akan digunakan sebagai penghambat bakteri dan dapat digunakan sebagai probiotik.

Menurut Rindiastuti (2008), probiotik didefinisikan sebagai salah satu makanan tambahan yang mengandung mikrobal hidup yang sangat berguna bagi kesehatan tubuh. Probiotik ini dibuat dari bahan-bahan mikroba yang ada di saluran cerna dan dapat membantu mengeliminasi antigen yang masuk bersama makanan. Penggunaan probiotik merupakan salah satu kontrol biologis untuk mengendalikan penyakit pada budidaya perikanan karena mikroba probiotik tidak bersifat patogen dan juga tidak menghasilkan senyawa racun yang justru merugikan hewan inang (Wanasuria, 2010). Selain itu, agen biologis ini telah berhasil digunakan dalam

repository.ub.ac.id

tangki-tangki pemeliharaan udang untuk perbaikan kualitas air dan menekan *Vibrio luminescens* (Rietje dan Febriani, 2008).

Kandidat probiotik yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan bakteri *Vibrio probioticus*. Penggunaan probiotik dari *V. probioticus* telah diteliti oleh Chytanya *et al.*, (2002), mengatakan bahwa strain ini mampu memberikan perlindungan larva kerang terhadap *V. anguillarum* dan patogen terkait pada saat pra perawatan. Bakteri yang menunjukkan aktivitas antagonis memiliki aplikasi potensial sebagai biokontrol. Sehingga penelitian ini dijadikan dasar dalam aktivitas penghambatan bakteri *V. harveyi* dengan menggunakan supernatan *V. probioticus* dengan konsentrasi yang berbeda.

## 1.2 Rumusan Masalah

Bakteri *V. harveyi* merupakan salah satu bakteri virulen yang ada pada budidaya air laut. *V. harveyi* dalam budidaya udang sebagai penyebab *Vibriosis* adalah bakteri patogen umum yang ada dalam budidaya udang yang dapat menyebabkan mortalitas tinggi pada fase larva dan budidaya pembesaran lobster (Rattanachuy *et al.*, 2007). *V. harveyi* menyerang dengan cara merusak lapisan kutikula yang mengandung khitin dikarenakan memiliki *chitinase*, *lipase*, dan *protease*. Penyakit udang menyala ini pada umumnya menyerang udang pada stadia *mysis* sampai awal pasca larva (Agung, 2007). Salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk pengendalian penyakit *V. harveyi* adalah dengan memanfaatkan bakteri *V. probioticus* sebagai kandidat probiotik dalam lingkungan perairan. Bakteri ini dapat menghasilkan zat antibakteri yang dapat menghambat atau membunuh bakteri lain, dalam hal ini adalah bakteri patogen (*V. harveyi*). Menurut Burgess *et al.*, (1991) dalam Uzair *et al.*, (2008), bakteri yang mempunyai zat antibakteri telah terbukti menghasilkan metabolit sekunder dan juga produk ekstraseluler yang dapat menampilkan sifat antibakteri. Bakteri *V. probioticus* aktif terhadap berbagai macam bakteri yang relatif. *V. probioticus* dikultur dan dibuat

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

menjadi supernatan. Supernatan inilah yang akan digunakan sebagai penghambat bakteri dan dapat digunakan sebagai probiotik. Pengendalian penyakit *Vibriosis* menggunakan probiotik merupakan salah satu alternatif yang dilakukan dan salah satunya dengan cara memanfaatkan bakteri *V. probioticus* sebagai kandidatnya.

Menurut Austin *et al.*, (1995), aktivitas antagonis *Vibrio* terbukti dapat menghambat sejumlah patogen, diantaranya penggunaan strain probiotik dari *Vibrio alginolyticus* membentuk perlawanan terhadap salmon yang diuji tantang dengan *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalli*. Selain itu probiotik tidak menimbulkan efek yang berbahaya bagi tubuh salmon itu sendiri. Menurut Balca'zar (2006), bahwa pemberian campuran bakteri strain *Bacillus* dan *V. probioticus* positif dapat mempengaruhi pertumbuhan dan kelangsungan hidup juvenil udang putih dan memberikan efek perlindungan terhadap patogen *V. harveyi* dan sindrom virus bercak putih (*white spot*). Perlindungan ini disebabkan oleh stimulasi sistem kekebalan tubuh, dengan meningkatkan sistem fagositosis dan aktifitas antibakteri.

Berdasarkan uraian di atas dapat diperoleh suatu informasi bahwa *V. probioticus* dapat dijadikan sebagai alternatif pengendalian penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh perbedaan konsentrasi supernatan *V. probioticus* untuk menghambat pertumbuhan *V. harveyi* sehingga dapat dimanfaatkan secara tepat dalam penanggulangan penyakit dalam budidaya perikanan.

Adapun perumusan masalah yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Apakah supernatan *V. probioticus* mempunyai pengaruh terhadap aktivitas penghambatan *V. harveyi* secara *in vitro*?
- Berapa konsentrasi terbaik supernatan *V. probioticus* yang dapat menghambat pertumbuhan *V. harveyi*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan konsentrasi supernatan *V. probioticus* terhadap aktivitas penghambatan *V. harveyi* dan mengetahui konsentrasi terbaik pemberian supernatan *V. probioticus* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.

### 1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai cara menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dengan menggunakan supernatan *V. probioticus* sebagai salah satu kandidat probiotik. Sehingga cara tersebut dapat diterapkan dalam usaha budidaya dalam upaya penanggulangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *V. harveyi*.

### 1.5 Hipotesis

$H_0$  : diduga pemberian supernatan *V. probioticus* dengan konsentrasi yang berbeda tidak dapat mempengaruhi aktivitas penghambatan *V. harveyi*.

$H_1$  : diduga pemberian supernatan *V. probioticus* dengan konsentrasi yang berbeda dapat mempengaruhi aktivitas penghambatan *V. harveyi*.

### 1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomedik, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan November 2010 sampai dengan Desember 2010.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Biologi *Vibrio harveyi*

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* dalam Agung (2007), *V. harveyi* diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Pseudomonadaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Spesies	: <i>Vibrio harveyi</i>

Bakteri adalah sel prokariotik yang khas dan uniseluler. Sel berisi massa sitoplasma dan inti yang tidak memiliki membran inti. Sel bakteri berbentuk bulat, batang, atau spiral. Reproduksi terutama dengan pembelahan biner sederhana yaitu proses aseksual (Pelczar dan Chan, 1986). Bakteri dibagi dalam golongan gram positif dan gram negatif berdasarkan reaksinya terhadap prosedur pewarnaan gram. Pada bakteri gram positif, kandungan utama dinding sel adalah peptidoglikan dan asam teikoat, sedangkan pada bakteri gram negatif dinding sel meliputi peptidoglikan dan membran luar (Fajariah, 2009).

*Vibrio harveyi* adalah suatu jenis Bakteri Gram-Negatif yang mempunyai suatu tangkai yang bentuknya bengkok dan secara khas ditemukan pada air laut, *Vibrio* bersifat fakultatif anaerob tes positif untuk oksidasi dan tidak membentuk spora. Semua anggota jenis ini adalah motil (bergerak) dan mempunyai kutub flagella dengan sarung pelindung (Fahri, 2009).

Bakteri *V. harveyi* merupakan bakteri dari jenis gram negatif, tidak berspora, biasanya berukuran 0,5  $\mu$  sampai 2  $\mu$  dan mempunyai alat gerak berupa flagella. Selain berbentuk batang sifatnya kaku dan termasuk kedalam gram negatif,

berbentuk lurus atau bengkok, bersifat oksidasi positif, katalase positif, proses fermentasi karbohidratnya tidak membentuk gas dan fakultatif anaerob (Bonang dan Koeswardono, 1982).

### 2.1.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Bakteri *V. harveyi* merupakan bakteri anaerobik fakultatif, yaitu dapat melakukan metabolisme dengan menggunakan oksigen atau tanpa menggunakan oksigen, katalase dan oksidase positif, dapat menfermentasikan gula dan menguraikan nitrat (Nurhidayah *et al.*, 2000). Dapat hidup pada kisaran suhu yang sangat luas antara 20 °C dan optimum pada suhu 30 °C (Bergey's, 2000). Salinitas optimum antara 20-30 ppt dan pH optimum berkisar antara 7,5-8,5 (Bauman *et al.*, 1984).

Menurut Pelczar dan Chan (1986), pertumbuhan bakteri mengacu pada perubahan dalam populasi total dan bukan perubahan dalam suatu individu organisme saja. Pada kondisi pertumbuhan seimbang ada suatu penambahan semua komponen selular (RNA, DNA, protein) secara teratur.

Menurut Dwijoseputro (2003), pada umumnya bakteri hanya mengenal satu macam pembiakan saja, yaitu pembiakan secara aseksual atau vegetatif. Pembiakan ini berlangsung sangat cepat, jika faktor-faktor luar menguntungkan. Pelaksanaan pembiakan yaitu dengan pembelahan diri atau *devisio*. Pembelahan diri dapat dibagi menjadi 3 fase, yaitu fase pertama, dimana sitoplasma terbelah oleh sekat yang tumbuh tegak lurus pada arah memanjang. Sekat tersebut diikuti oleh suatu dinding yang melintang. Dinding melintang ini tidak selalu merupakan penyekat yang sempurna, ditengah-tengah sering ketinggalan suatu lubang kecil. Dimana protoplasma kedua sel baru masih tetap berhubungan. Hubungan protoplasma itu disebut *plasmodesmida*. Fase terakhir adalah terpisahnya kedua sel. Ada bakteri yang segera berpisah, yaitu yang satu terlepas sama sekali daripada yang lain, setelah dinding melintang menyekat secara sempurna. Bakteri yang semacam ini merupakan koloni yang merata, jika dipiara pada medium padat.

Sebaliknya, bakteri-bakteri yang dindingnya lebih kokoh itu tetap bergandeng-gandengan setelah pembelahan. Bakteri merupakan koloni yang kasar permukaannya.

### 2.1.3 Habitat

Bakteri *Vibrio spp* termasuk jenis bakteri *halofil*, yaitu bakteri yang dapat hidup pada salinitas tinggi yaitu 20-33 ppt, dan salinitas yang optimum adalah 20-30 ppt, sedangkan pH yang optimum adalah 7,5-8,5. Bakteri ini dapat ditemukan di habitat akuatik dengan kisaran salinitas yang luas dan beberapa spesies ditemukan di habitat air tawar (Bauman *et al.*, 1984).

Menurut (Agung, 2007), bakteri ini selain didapatkan di air laut juga ditemukan di air payau. *V. harveyi* termasuk bakteri yang bersifat *halofil*, yaitu tumbuh dengan rentang toleransi salinitas 5-80 ppt dan tumbuh optimal pada salinitas 20-40 ppt.

Medium umum yang dapat digunakan untuk kultur *V. harveyi* antara lain medium BHI (*Broth Heart Infision*), TSA (*Tryptic Soy Agar*), TSB (*Tryptic Soy Broth*), NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*) serta medium TCBS (Sunaryanto *et al.*, 1987).

### 2.1.4 Infeksi dan Tanda-Tanda Penyerangan

*Vibrio* merupakan patogen oportunistik yang dalam keadaan normal ada dalam lingkungan pemeliharaan, kemudian berkembang dari sifat yang saprofitik menjadi patogenik jika kondisi lingkungannya memungkinkan (Feliatra, 1999). Menurut Agung, (2007), *V. harveyi* menyerang dengan cara merusak lapisan kutikula yang mengandung khitin dikarenakan memiliki *chitinase*, *lipase*, dan *protease*. Penyakit udang menyala ini pada umumnya menyerang udang pada stadia *mysis* sampai awal pasca larva.

Larva udang yang terserang *V. harveyi* pada kondisi gelap tampak berpendar sedangkan udang yang dipelihara di tambak seperti ada cahaya jika tambak ditiup angin. Udang yang terserang biasanya berenang di tepi pematang,

dengan tanda-tanda kulit badan rusak dan berwarna gelap atau merah, bagian ekor dan kaki renang merah, insang cokelat, otot atau dagingnya berwarna suram dan ususnya kosong, gerakannya lemah dan menyentak-nyentak (Rukyani, 1999).

Gejala yang ditimbulkan tergantung pada tingkat serangan. Beberapa gejala yang terlihat adalah punggung kehitam-hitaman, bercak merah pada pangkal sirip, sisik tegak, bergerak lamban, keseimbangan terganggu dan nafsu makan berkurang. Gejala lain yang sering terjadi adalah mata menonjol, perut kembung berisi cairan warna kuning muda, pendarahan pada insang, mulut, tubuh, usus dan organ dalam. Apabila sampai fase ini ikan atau udang belum mati, maka gejala penyakit akan berkembang seperti kulit mengelupas, koreng atau nekrosis pada beberapa bagian tubuh dan dapat pula berbentuk borok (Prajitno, 2007).

Umumnya ikan yang diserang *Vibriosis* memperlihatkan gejala-gejala seperti kehilangan nafsu makan (anorexia), kulit ikan menjadi gelap, insang menjadi pucat, sering terjadi pembengkakan pada kulit yang lama kelamaan akan pecah menjadi luka (bisul) dan mengeluarkan cairan nanah berwarna kuning kemerah-merahan, terjadi pendarahan pada dinding perut dan permukaan jantung, dan jika dilakukan pembedahan akan terlihat pembengkakan dan kerusakan pada jaringan hati, ginjal, dan limpa (Kordi, 2001). Begitu juga dengan usus (terutama pada usus besar) menggebung dan berisi cairan kental dan bening. Bila *Vibriosis* menyerang pada stadium gelondongan (benih yang masih kecil), gejala klinisnya tidak begitu jelas. Seluruh tubuhnya tertutup oleh lapisan lendir yang tebal dengan disertai luka-luka kecil yang tidak pecah.

## 2.2 *Vibrio probioticus*

*Vibrio probioticus* termasuk dalam batang gram negatif dan dapat bergerak dengan cara kutub tunggal flagella. Bakteri ini tergolong katalase positif dan oksidasi negatif. Kepadatan tidak terdeteksi, serta dapat menghambat berbagai

bakteri *phytopatogen*. Sifatnya yaitu fakultatif anaerob yaitu mampu tumbuh pada fermentasi aerobik dan anaerobik (Kumar dan Nair, 2007).

*V. probioticus* adalah salah satu bakteri yang bersifat nonpatogen sehingga dapat digunakan sebagai kandidat probiotik yang dapat menghambat bakteri *V. harveyi* yang bersifat patogen. Bakteri *V. probioticus* aktif terhadap berbagai macam bakteri yang relatif. Bakteri patogen dapat dihambat pertumbuhannya atau dibunuh dengan proses fisik (misalnya dengan pemanasan) atau bahan kimia (misalnya dengan antibiotik) (Liana, 2010). Cara kerja mikroorganisme probiotik dalam kaitannya dengan bakteri patogen meliputi berbagai model yaitu dengan cara menghasilkan senyawa penghambat, berkompetisi terhadap ketersediaan unsur kimia maupun energi, berkompetisi untuk memperoleh tempat pelekatan, meningkatkan respon imun hewan inang, memperbaiki kualitas lingkungan budidaya, berinteraksi dengan *phytoplankton* sebagai sumber nutrisi mikro dan makro, serta menghasilkan enzim untuk meningkatkan pencernaan.

Penanggulangan penyakit dapat dilakukan dengan cara memanfaatkan bakteri lain yang bersifat nonpatogen. Bakteri ini dapat menghasilkan zat antibakteri yang dapat menghambat atau membunuh bakteri lain, dalam hal ini adalah bakteri patogen (*V. harveyi*). Menurut Burgess *et al.*, (1991) dalam Uzair *et al.*, (2008), bakteri yang mempunyai zat antibakteri telah terbukti menghasilkan metabolit sekunder dan produk ekstraseluler yang dapat menampilkan sifat antibakteri. Menurut Jha *et al.*, (2004), beberapa spesies *Vibrio* telah ditemukan menghasilkan berbagai ekstraseluler protease. Salah satu contohnya adalah bakteri *V. probioticus* yang aktif terhadap berbagai macam bakteri yang relatif. *V. probioticus* menunjukkan efek antagonis yang kuat setelah diinkubasi pada medium agar padat dan menunjukkan aktivitas lemah dalam medium cair. *V. probioticus* dikultur dan dibuat menjadi supernatan. Supernatan yang dihasilkan berisi produk ekstraseluler didalamnya yang biasanya berupa enzim. Menurut Prasad *et al.*, (2005), supernatant tidak diaktivasi oleh lipase, K proteinase, pepsin, trypsin, dan E

pronase. Menurut Sugita *et al.*, (2007), kultur supernatan dibuat dari media agar sebanyak 100 ml kemudian dituang dalam media agar dan diinkubasi selama 24 jam pada 25 °C. setelah itu disentrifugasi selama 20 menit, cairan disaring melalui filter membran dengan ukuran pori 0,2 mm dan akhirnya didapatkan supernatan. Supernatan inilah yang akan digunakan sebagai penghambat bakteri dan dapat digunakan sebagai kandidat probiotik. Menurut Sugita *et al.*, (1997), konsentrasi supernatan *V. probioticus* yang digunakan setelah diinkubasi berkisar antara 10% sampai 100%.

Menurut Pelczar dan Chan (1986), mekanisme penghambatan yang dilakukan biasanya dengan merusak dinding sel dengan menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah terbentuk, perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan keluarnya bahan makanan dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, penghambatan sintesis protein dan asam nukleat. Sedangkan menurut Prasad *et al.*, (2005), bakteriosin baik yang dilaporkan dari bakteri Gram-negatif yaitu *E. coli*, disebut sebagai colicins. Sebagian kecil bakteriosin telah diidentifikasi pada organisme Gram-negatif lainnya, misalnya, pyocins dalam *Pseudomonas sp.* (Yakub, 1954), vibriocin dalam “vibrio koma”. Colicins dapat berperan sebagai bakteriosin pada bakteri Gram-negatif lainnya. Mereka memiliki karakteristik umum tertentu, seperti menjadi plasmid yang dikodekan dan saat pelepasan, biasanya melibatkan lisis produsen, meskipun ada pengecualian, mekanisme lisis tidak jelas. Selanjutnya, produksi colicins kebanyakan dimediasi oleh regulon SOS, dan secara semu dapat merusak agen DNA, seperti mitomycin C dan UV. Produksi bakteriosin dianggap sebagai salah satu sistem pertahanan yang ditampilkan oleh bakteri dan mungkin berfungsi untuk mediasi intra-spesifik atau interaksi di tingkat populasi yang kemungkinan oleh adanya persaingan antagonisme pada strain yang sensitif.

Menurut Liana (2010), pemberian antimikroba dapat menghambat perakitan dinding sel dan mengakibatkan penggabungan rantai glikan tidak terhubung silang

ke dalam peptidoglikan dinding sel menuju suatu struktur yang lemah dan menyebabkan kematian bakteri. Tekanan dalam pada bakteri gram positif 3-5 kali lebih besar daripada bakteri gram negatif. Kerusakan pada dinding sel atau hambatan pada pembentukannya dapat berakibat lisis pada sel. Lisisnya sel bakteri tersebut dikarenakan tidak berfungsinya lagi dinding sel yang mempertahankan bentuk dan melindungi bakteri. Menurut Agung (2007), probiotik adalah agen mikrob hidup yang memberikan pengaruh menguntungkan pada inang dengan memodifikasi komunitas mikroba atau berasosiasi dengan inang, menjamin perbaikan dalam penggunaan pakan atau memperbaiki nutrisinya, memperbaiki respon inang terhadap penyakit atau memperbaiki kualitas lingkungannya.

Peningkatan resistensi kolonisasi atau menghalangi efek langsung terhadap patogen merupakan faktor penting dimana probiotik dapat mengurangi insiden dan durasi penyakit. Strain probiotik telah ditunjukkan digunakan untuk menghambat bakteri patogen baik *in vitro* dan *in vivo* yang berbeda melalui beberapa mekanisme. Beberapa manfaat yang terkait dengan probiotik diantaranya adalah pengecualian kompetitif bakteri, sumber nutrisi dan kontribusi enzim untuk pencernaan, media penyerapan langsung materi organik terlarut oleh bakteri, peningkatan sistem kekebalan tubuh sebagai respon terhadap mikroorganisme patogen dan memiliki efek antivirus (Balca'zar *et al.*, 2006).

Menurut Wanasuria (2010), peranan probiotik antara lain :

1. Menekan populasi mikroba yang bersifat merugikan yang berada dalam saluran pencernaan.
2. Menghasilkan senyawa anti mikroba yang secara langsung akan menekan pertumbuhan mikroba patogen dan mencegah terbentuknya kolonisasi mikroba merugikan dalam system pencernaan hewan inang.
3. Menghasilkan senyawa yang bersifat imunostimulan.

### 2.3 Uji Tantang Supernatan *Vibrio probioticus* Terhadap *Vibrio harveyi* dengan Menggunakan *Well Diffusion Method* (Metode Difusi Sumuran)

Uji tantang adalah uji yang dilakukan untuk melihat kemampuan penghambatan kandidat bakteri penghambat terhadap pertumbuhan bakteri patogen hasil isolasi. Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan dalam uji anti mikroba. Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, lubang, dan cakram kertas.

Uji difusi sumuran diperkenalkan oleh Schillinger dan Lucke pada tahun 1989. Metode lubang (sumuran) yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan larutan yang akan diuji (Liana, 2010). Pengujian dilakukan dengan mengukur zona hambatan yang berwarna bening pada gel.

Menurut Budiyantri (2009), metode difusi agar pada cara sumuran, dilakukan dengan cara menambahkan suspensi bakteri hingga konsentrasi  $10^8$  CFU/ml yang kemudian dioleskan pada media agar hingga rata. Setelah itu media agar dibuat sumuran dan pada lubang sumuran tersebut diteteskan larutan antibakteri di dalamnya. Ditunggu hasilnya dan pembacaan hasil dilakukan seperti cara Kirby Bauer. Cara pembacaan tersebut yaitu :

- a). *Radical zone* yaitu suatu daerah di sekitar *disk* atau sumuran dimana sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri. Potensi antibakteri diukur dengan mengukur diameter dari zona radikal.
- b). *Irradical zone* yaitu suatu daerah di sekitar *disk* atau sumuran dimana pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibakteri, tetapi tidak dimatikan.

Faktor-faktor yang mempengaruhi ukuran diameter zona penghambatan antara lain :

- Kekeruhan suspensi bakteri, kurang keruh dibuktikan dengan: diameter zona lebih besar dan jika lebih keruh dibuktikan dengan: diameter zona makin sempit sehingga R dilaporkan S atau sebaliknya.
- Waktu pengeringan atau peresapan suspensi bakteri ke dalam MH agar. Tidak boleh melebihi batas waktu karena dapat mempersempit diameter zona hambatan sehingga S jadi R.
- Temperatur inkubasi untuk pertumbuhan yang optimal adalah  $35^{\circ}\text{C}$ , apabila kurang atau lebih dari  $35^{\circ}\text{C}$  terdapat bakteri yang kurang subur pertumbuhannya dan terdapat obat yang difusinya kurang baik.
- Waktu inkubasi yaitu selama 24 jam.



### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Alat-Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada saat penelitian ini adalah:

- Tabung reaksi
- Erlenmeyer
- Gelas ukur
- Petridish
- Pipet mikro
- Rak tabung reaksi
- Pipet ukur
- Autoklaf
- Inkubator
- Lemari pendingin
- Jarum ose
- Pembakar bunsen
- Karet penghisap
- Timbangan Sartorius
- Mikroskop
- Spatula
- Sprayer
- Kompor
- Sentrifuge
- Spektrofotometer
- Cetakan sumuran
- *Water bath*
- Camera digital



### 3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada saat penelitian ini adalah :

- Biakan murni bakteri *Vibrio harveyi*
- Biakan murni bakteri *Vibrio probioticus*
- Aluminium foil
- Kapas Steril
- TSA (*Triptic Soya Agar*)
- TSB (*Triptic Soya Broth*)
- Filter mikro 0,2 mm
- Bacto Agar
- Kertas label
- Tissue
- Aquadest steril
- Alkohol 70%
- Spirtus

### 3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil. Hasil yang akan didapat menegaskan bagaimana hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki dan berapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk perbandingan (Nazir, 1988).

### 3.3 Rancangan Percobaan

Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dimana setiap perlakuan dilakukan sebagai satuan tersendiri, tidak ada hubungan pengelompokan. Rancangan ini digunakan dalam satu percobaan homogen, artinya

keragaman dalam satuan percobaan tersebut kecil, sehingga hasil penelitian diperoleh dari perlakuan dan faktor kebetulan saja.

Menurut Gasperz (1991), beberapa keuntungan dari penggunaan RAL, yaitu:

- Denah perancangan percobaan lebih mudah.
- Analisis statistika terhadap subyek percobaan sangat sederhana.
- Fleksibel dalam penggunaan jumlah perlakuan dan jumlah ulangan.
- Kemungkinan kehilangan informasi data hilang lebih kecil.

Rancangan Acak Lengkap (RAL) menurut Yitnosumarno (1993), dapat dirumuskan sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \sum_{ij}$$

Keterangan:

$Y_{ij}$  = hasil pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

$\mu$  = nilai rata-rata

$\alpha_i$  = pengaruh perlakuan ke-i

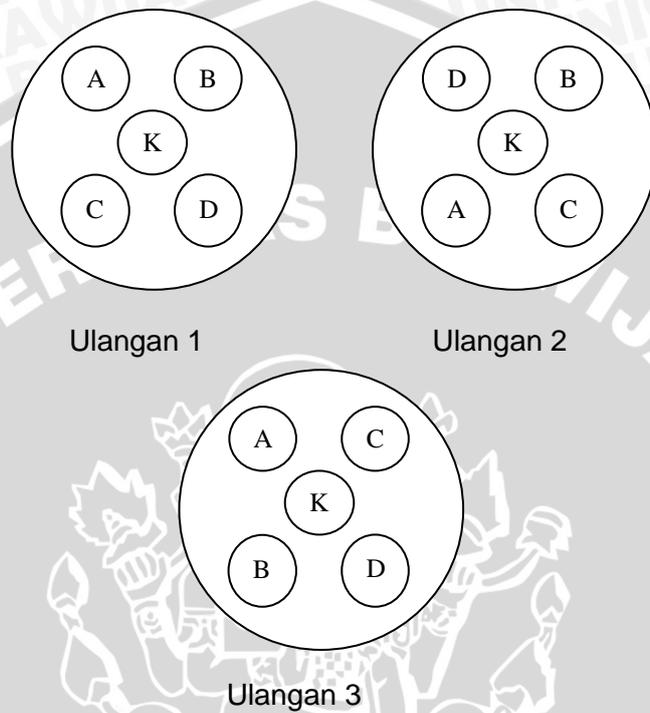
$\sum_{ij}$  = pengaruh galat (sisa) dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Penentuan konsentrasi dilakukan dengan melakukan penelitian pendahuluan terlebih dahulu. Penelitian pendahuluan ini dilakukan dengan cara berseri yaitu dengan konsentrasi 0 %; 12,5 %; 25 %; 50 %; dan 100 %. Hasil pada penelitian pendahuluan antara lain dengan diameter zona hambat sebesar 6 mm pada konsentrasi 0 % (kontrol), 8 mm pada 12,5 %, 11 mm pada 25 %, 11,5 mm pada 50 %, dan 11 mm pada 100 %. Penelitian ini terdiri dari 4 perlakuan, 3 kali ulangan dan 1 kontrol. Sebagai perlakuan adalah pemberian supernatan *Vibrio probioticus* dengan konsentrasi yang berbeda untuk mengetahui daya hambat bakteri patogen. Untuk menentukan konsentrasi yang akan diberikan, sebelumnya telah dilakukan penelitian pendahuluan. Adapun perlakuan tersebut adalah sebagai berikut:

- A = konsentrasi 12,5 %
- B = konsentrasi 25 %

- C = konsentrasi 37,5 %
- D = konsentrasi 50 %
- K = kontrol (tanpa perlakuan)

Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah percobaan seperti pada Gambar 1. berikut ini:



**Gambar 1. Denah Percobaan**

Keterangan:

- A, B, C, D = perlakuan  
 K = kontrol  
 1,2,3 = ulangan

### 3.4 Persiapan Bakteri *Vibrio probioticus*

Menurut Fadjar *et al.*, (2010), proses isolasi sampai dengan identifikasi bakteri *Vibrio probioticus* adalah sebagai berikut :

#### 3.4.1 Persiapan Sampel

- Disiapkan pipa PVC (diameter 5 cm) dan disterilkan menggunakan disinfektan (5-10 ppm chlorine) atau alkohol 70 %.
- Pipa dicuci sebanyak tiga kali dengan menggunakan air steril.

- c. Diambil sedimen dengan menggunakan pipa PVC dan dimasukkan ke dalam wadah yang disterilkan.
- d. Diambil sampel air dengan water sampler sebanyak  $\frac{3}{4}$  botol.
- e. Ditutup botol sampel dengan menggunakan kapas dan aluminium foil.

#### 3.4.2 Isolasi Bakteri

- a. Disiapkan tanah sebanyak 1 gram dicampur dengan 9 ml air laut steril.
- b. Disaring menggunakan filter nilon fl 60 mm.
- c. Direndam dalam 10 ml larutan NaCl elektrolisis selama 5 menit.
- d. Dibilas dengan air steril kemudian diencerkan sampel dengan air suling steril.
- e. Diambil 0,1 ml suspensi dan dilapisi pada media agar.
- f. Dikultur pada suhu 27 °C selama 1 minggu.
- g. Masing-masing koloni diinokulasi pada 1/5 nutrien dan diencerkan.
- h. Dibandingkan karakteristik *V. probioticus* dan diuji dengan menggunakan kit Microbact™ (pyridam).

#### 3.4.3 Identifikasi Bakteri

- a. Diambil 1 ose isolat dan diencerkan ke dalam buffer saline.
- b. Dimasukkan 4 tetes suspensi bakteri ke dalam setiap lubang pada test strip.
- c. Ditambahkan 2 tetes mineral oil pada lubang yang berwarna hitam.
- d. Segel test strip ditutup dan diinkubasi pada 35 °C $\pm$ 2 °C selama 18-24 jam.
- e. Test strip dipindahkan dari inkubator dan ditambah dengan reagen dalam setiap lubang, hasil diinterpretasikan menggunakan Microbact™ *Identification Package*.

#### 3.4.4 Uji Penghambatan

- a. Stok kultur bakteri disubkultur selama 2 kali 18 jam pada TSB yang telah ditambah 1,5 % NaCl agar tumbuh aktif.

- b. Kemudian disesuaikan dengan standar mcFarland ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ml).
- c. Diseka di atas permukaan media TSA (1,5 % NaCl) dan diulang agar merata.
- d. Diletakkan kertas cakram (diameter 7 mm) dan ditekan di atas media TSA dan 70  $\mu$ l dari kultur calon bakteri yang akan diisolasi dalam medium LB selama 18 jam.
- e. Diinkubasi pada suhu 36 °C selama 24 jam yang kemudian diukur diameter daerah hambatannya.

#### 3.4.5 Analisis Spesies Bakteri Menggunakan 16s rDNA

- a. DNA genom *V. probioticus* diisolasi dan menggunakan kultur 1,5 ml kultur bakteri.
- b. Disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit pada suhu 4°C.
- c. Pelet yang ada ditambahkan dengan 573  $\mu$ L buffer TE, 15  $\mu$ L SDS 20 %, 12  $\mu$ L proteinase K sebanyak 5 kg/ml.
- d. Diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C.
- e. Ditambah 100  $\mu$ L NaCl 5 M dan 80  $\mu$ L CTAB.
- f. Campuran diinkubasi pada suhu 65 °C selama 10 menit.
- g. Ditambah dengan kloroform (1:1), kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3600 g selama 5 menit pada suhu 4 °C.
- h. Supernatan ditambahkan 0,6 ml isopropanol dan dikocok pelan.
- i. Diambil presipitat DNA dan dimasukkan ke dalam ependorf yang baru.
- j. Presipitat DNA ditambah dengan 0,5 ml etanol 70 % dan disentrifugasi dengan kecepatan 3600 g selama 5 menit pada suhu 4 °C.
- k. Pelet dikeringkan dan diinkubasi pada suhu 37 °C kemudian ditambahkan 100  $\mu$ L TE buffer.

#### 3.4.6 16s rDNA

- a. DNA plasmid dimurnikan dengan menggunakan QIAprep Spin miniprep Kit dan mikrosentrifugasi.

- b. Pemurnian dilakukan sampai 20 µg DNA plasmid dari 1-5 ml *E. Coli* yang telah ditumbuhkan satu malan di media LB (Luria-Bertani).
- c. Plasmid dikirim ke Eurofins MWG, Munchen, Jerman untuk identifikasi 16s rDNA menggunakan kode *Vibrio* sp. X110-8.

### 3.5 Prosedur penelitian

#### 3.5.1 Persiapan penelitian

##### 3.5.1.1 Sterilisasi Alat dan bahan

Langkah-langkah yang dilakukan dalam sterilisasi alat dan bahan antara lain sebagai berikut :

- a. Alat-alat yang akan digunakan dicuci dengan menggunakan detergen, dikeringkan kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas perkamen atau kertas koran, kemudian diikat dengan menggunakan benang.
- b. Air secukupnya dituang kedalam autoklaf, kemudian alat yang telah dibungkus kertas pekarmen dimasukkan kedalam autoklaf dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara silang.
- c. Kompur pemanas dinyalakan, setelah beberapa saat monometer akan menunjukkan angka 1 atm, jika terjadi kelebihan tekanan buka kran udara hingga monometer menunjukkan angka 1 atm kembali.
- d. Keadaan tekanan uap jenuh dapat terjadi berulang kali sampai suhu 121 °C dan monometer menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit.
- e. Kompur dimatikan dan kran dibuka untuk mengurangi tekanan. Tunggu beberapa saat sampai termometer dan monometer menunjukkan angka 0 (nol) lalu buka penutup autoklaf dengan cara zig-zag.
- f. Alat dan bahan yang sudah disterilkan dikeluarkan dari autoklaf, kemudian disimpan dalam inkubator sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

### 3.5.1.2 Pembuatan Media

#### A. Media BHI (*Brain Heart Infusion*)

- a. Media BHI ditimbang sebanyak 37 gram dan dilarutkan dengan 1000 ml aquades dalam erlenmeyer.
- b. Media diaduk hingga larut sempurna dan dimasukkan ke dalam botol sebanyak 1000 ml.
- c. Selanjutnya larutan dipanaskan di *water bath* pada suhu 100 °C selama 15 menit sampai terlarut sempurna.
- d. Kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.
- e. Diinkubasi pada suhu 37 °C.

#### B. Media TCBS (*Thiosulfate Citrate Bilesalt Sucrose*)

- a. Media TCBS ditimbang sebanyak 35,5 gram dan dicampurkan dengan sodium chlorida sebanyak 8,0 gram.
- b. Kedua bahan tersebut dilarutkan dengan 500 ml aquadest dalam erlenmeyer.
- c. Media dipanaskan selama 20 menit sambil sesekali diaduk.
- d. Setelah itu, media didiamkan sejenak sampai tidak terlalu panas dan media dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 15-25 ml secara aseptik.

#### C. Medium Agar Keras

- a. Ditimbang 4 gram TSA kemudian dimasukkan ke dalam erlemeyer 250 ml dan ditambahkan 100 ml aquadest.
- b. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan dipanaskan di *water bath* 100°C selama 15 menit dengan sesekali diaduk sampai larut sempurna.
- c. Larutan TSA kemudian disterilisasi pada autoklaf 121°C selama 15 menit.

- d. Larutan TSA yang sudah disterilkan kemudian didinginkan sampai suhu  $\pm 50^{\circ}\text{C}$  (hangat-hangat kuku).
- e. Selanjutnya media TSA dituangkan dicawan petri steril  $\pm 20$  ml dan dibiarkan hingga dingin dan mengeras,
- f. Selanjutnya media TSA dimasukkan kedalam inkubator suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam untuk uji sterilitas.

#### D. Medium Agar Lunak

- a. 3 gram TSB dimasukkan kedalam erlemeyer 250 ml dan ditambahkan bacto agar 0,8 gram dan aquadest 100 ml, kemudian dihomogenkan.
- b. Larutan TSB dipanaskan di *water bath*  $100^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit dengan sesekali digoyang sampai sampai larut sempurna.
- c. Selanjutnya larutan TSB dipipet kedalam tabung masing-masing 10 ml, ditutup dengan kapas, dan disterilisasi pada autoklaf  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.
- d. Media TSB didinginkan  $\pm 50^{\circ}\text{C}$ , sehingga medium agar lunak siap untuk digunakan.

#### E. Pembuatan Medium Sumuran

- a. Alat sumuran ditancapkan pada media agar keras dan ditambahkan suspensi bakteri OD : 0,1 sebanyak 0,1 ml.
- b. Kemudian media agar lunak (hangat-hangat kuku) dituangkan, diputar searah jarum jam.
- c. Dibiarkan hingga dingin dan menjadi padat.
- d. Jika media sudah benar-benar memadat alat sumuran segera diambil.
- e. Media siap untuk dipakai, dengan cara memasukkan kandidat anti mikroba kedalam sumuran masing-masing 50  $\mu\text{l}$ .
- f. Selanjutnya media diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam.

### 3.5.2 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.5.2.1 Pembuatan Biakan Bakteri *V. harveyi*

- Petri disk yang berisi media TCBS yang telah disterilkan disiapkan terlebih dahulu.
- Kemudian isolat bakteri yang diambil dari biakan murni *V. harveyi* digoreskan pada masing-masing cawan petri menggunakan jarum ose yang sebelumnya telah dipanaskan (hingga berpijar) di atas api bunsen.
- Setelah itu cawan petri ditutup rapat dan dipanaskan di atas bunsen pada bagian tepinya. Media yang telah terisi bakteri diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 24 jam.

#### 3.5.2.2 Pewarnaan Gram (*Gram Staining*)

Pewarnaan gram adalah pewarnaan diferensial yang sangat berguna dan paling banyak digunakan dalam laboratorium mikrobiologi, karena merupakan tahapan penting dalam identifikasi (Viramedika, 2008). Bakteri yang sudah ditumbuhkan pada media padat, selanjutnya dilakukan pewarnaan gram. Tahapan pewarnaan gram yaitu

- Semprot kaca objek dengan alkohol, kemudian lap dengan tissue dan dibakar pada api bunsen untuk menghilangkan sisa alkohol.
- Jarum ose dibakar sampai berpijar dan didiamkan sebentar sampai dingin.
- Biakan bakteri yang berasal dari cawan petri diambil menggunakan jarum ose dan diletakkan pada kaca objek.
- Selanjutnya dilakukan fiksasi sampel bakteri pada api bunsen dengan jarak 20 cm dari api supaya tidak terlalu panas sehingga tidak merusak bentuk sel bakteri.
- Tambahkan setetes pewarnaan kristal violet dan diamkan selama 2 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir.

- f. Ditetesi lagi dengan lugol dan diamkan selama 1 menit. Bilas dengan alkohol selama 30 detik, kemudian baru dibilas dengan air mengalir.
- g. Diwarnai dengan safranin selama 15 detik dan dibilas kembali dengan air mengalir.
- h. Didiamkan dan dikeringkan untuk selanjutnya dapat diamati pada mikroskop.

#### 3.5.2.3 Persiapan Bakteri Uji (*V. probioticus*)

- a. Bakteri uji dari stock bakteri diisolasi di medium selektif untuk mendapatkan bakteri murni kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- b. Koloni diambil terpisah 1-2 koloni, dimasukkan kedalam medium cair TSB dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- c. Kultur bakteri yang telah tumbuh dispektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm, untuk mendapatkan OD :0,1.
- d. Suspensi bakteri dengan OD : 0,1 tersebut siap untuk dipakai sebagai uji anti mikroba.

#### 3.5.2.4 Pembuatan Supernatan *V. probioticus*

- a. Ekstrak pankreas ditimbang sebanyak 17 gram.
- b. Ditambahkan ekstrak papaic dari kacang 3 gram dan dicampur Sodium chloride 5 gram, yang terakhir ditambah Dibasic potassium phosphate 2,5 gram.
- c. Dicampur dan dilarutkan dalam 1 liter aquades.
- d. Diinkubasi pada pH 7,3
- e. Disterilisasi dengan suhu 121 °C selama 15 menit.
- f. Disiapkan isolat *V. probioticus* kemudian dikultur di medium tersebut pada suhu 30 °C selama 2 kali 24 jam.
- g. Hasil kultur disentrifugasi sebesar 3600 rpm selama 15 menit.
- h. Didapatkan hasil (supernatan).

### 3.5.3 Uji Tantang Supernatan *V. probioticus* Terhadap *Vibrio harveyi*

- a. Hasil isolasi bakteri *V. probioticus* disentrifugasi sebesar 3600 rpm selama 15 menit untuk dijadikan supernatan.
- b. Supernatan disaring dengan menggunakan filter mikro 0,22 mm kemudian supernatan diencerkan untuk menghasilkan konsentrasi yang diinginkan (12,5%, 25%, 37,5%, 50%).
- c. Setelah diencerkan supernatan diambil dengan pipet mikro sebanyak 50 $\mu$ l dan dimasukkan dalam lubang sumuran dengan diameter 6 mm.
- d. Hasil uji difusi sumuran diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 24 jam.
- e. Kemudian diamati diameter daerah hambatan (zona hambat) dari uji tantangan tersebut.

## 3.6 Parameter Uji

### 3.6.1 Parameter Utama

Parameter utama yang digunakan adalah dengan menggunakan parameter kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari pengukuran daerah hambatan *V. probioticus* terhadap pertumbuhan bakteri *V. harveyi* pada masing-masing perlakuan yang terlihat di sekitar lubang sumuran dengan menggunakan penggaris.

### 3.6.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang pada penelitian ini adalah suhu inkubator dan pH media, yang keduanya merupakan faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri.

## 3.7 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian, kemudian dianalisis secara statistik manual dengan menggunakan analisis keragaman sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Apabila dari data sidik ragam diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata (*significant*) atau berbeda sangat nyata (*highly significant*), maka untuk membandingkan nilai

antar perlakuan dilanjutkan dengan uji BNT (beda nyata terkecil). Sedangkan untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan hasil yang dipengaruhi, dilakukan perhitungan analisis regresi yang bertujuan untuk mengetahui sifat dan fungsi regresi yang memberikan keterangan tentang pengaruh perlakuan terbaik pada respon.

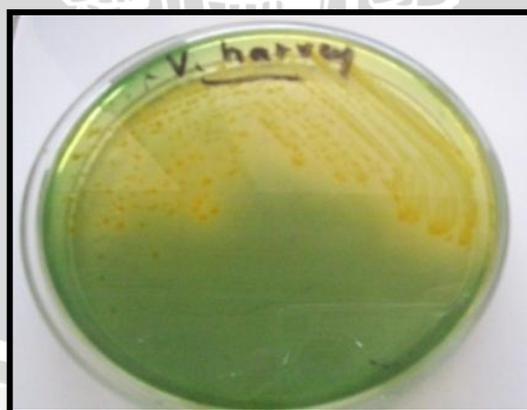


## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Kultur *Vibrio harveyi*

Bakteri *V. harveyi* yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan murni yang diperoleh dari Balai Karantina Ikan (BKI) Juanda, Surabaya. Hal ini sesuai dengan hasil identifikasi dari BKI Juanda yang menyatakan bahwa spesies tersebut adalah *V. harveyi* (Lampiran 1). Biakan ini kemudian diperbanyak dengan metode strik (gores) pada media padat TCBSA. Dengan menumbuhkan bakteri pada media agar (padat) maka akan tumbuh beberapa bakteri. Menurut Pelzcar dan Chan (1986), setelah diinkubasi, sel-sel mikroba individu itu memperbanyak diri sedemikian cepatnya sehingga di dalam waktu 18 sampai 24 jam terbentuklah massa sel yang dapat dilihat dan dinamakan koloni. Koloni ini tampak oleh mata telanjang.

Berdasarkan hasil pengamatan selama penelitian, bakteri *V. harveyi* yang tumbuh pada media padat TCBSA secara visual membentuk koloni berwarna kuning dan bentuk koloni membulat dengan permukaan cembung. Hasil biakan bakteri *V. harveyi* (Gambar 2).



**Gambar 2. Kultur Murni *Vibrio harveyi***

Bonang dan Koeswardono (1982), menyebutkan bahwa kuman ini akan membentuk koloni yang berwarna kuning muda pada perbenihan TCBSA. Hal ini berkaitan dengan kemampuan *V. harveyi* untuk memanfaatkan sukrosa. Zafran dan

Ibnu (2004), menjelaskan bahwa *V. harveyi* yang mampu menguraikan sukrosa, koloninya akan berwarna kuning pada media TCBSA dan yang tidak mampu menguraikan sukrosa maka koloninya akan berwarna hijau.

Menurut Tompo dan Susianingsih (2004), bakteri *V. harveyi* yang ditumbuhkan pada media TCBSA secara visual memiliki ciri-ciri : bentuk koloni bundar atau bulat, tumbuh menyebar dengan berbagai ukuran, permukaan cembung atau rata, berwarna kehijauan, kuning kehijauan, kuning, hijau dan ada yang bercahaya dalam gelap. Sedangkan pengamatan koloni bakteri *V. harveyi* yang tumbuh pada media padat TCBSA secara visual membentuk koloni berwarna kuning dan koloni membulat dengan permukaan cembung. Warna kuning pada koloni *V. harveyi* yang dibiakkan pada media TCBSA, hal ini berkaitan dengan kemampuan bakteri *V. harveyi* dalam memanfaatkan sukrosa.

Zafran *et al.*, (1997) dalam Winarti (2004) menjelaskan bahwa bakteri *V.harveyi* yang mampu menguraikan sukrosa, koloninya akan tampak kuning pada media TCBSA dan yang tidak mampu menguraikan sukrosa maka koloninya akan berwarna hijau pada media TCBSA.

#### **4.2 Hasil Identifikasi Bakteri *Vibrio probioticus***

Bakteri *V. probioticus* yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari kolam udang tradisional yang berada di Balai Pengembangan Budidaya Air Payau (BPBAP), Bangil, Pasuruan, Jawa Timur. Setelah didapatkan sampel bakteri pada sedimen, dilakukan uji bakteri sedimen dan bakteri air. Hasil strain bakteri yang didapat dari sampel air dan sedimen yang telah diuji secara kimia dan morfologi dapat dilihat pada Lampiran 2. Uji penghambatan yang dilakukan adalah untuk mengetahui karakteristik masing-masing bakteri penghambat dan mengetahui besarnya daya hambat yang mampu dihasilkan masing-masing bakteri sehingga dapat diketahui jenis bakteri apa saja yang berasal dari kolam udang tradisional dan mampu menghambat bakteri *V. harveyi*. Uji penghambatan tersebut dilakukan

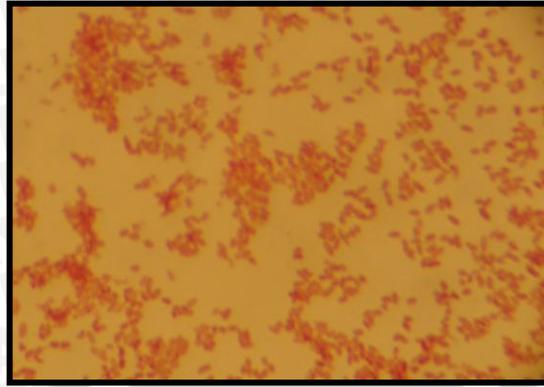
terhadap bakteri *V. harveyi* dengan menggunakan metode kertas cakram. Hasil terbesar menunjukkan bahwa hambatan yang paling kuat dilakukan oleh bakteri sp4 (*V. probioticus*) (Gambar 3). Sedangkan untuk mengetahui jenis bakteri yang ada, dilakukan uji DNA. Uji tersebut dinamakan uji kimia 16s rDNA. Hasil uji secara biomolekuler ini bakteri yang teridentifikasi adalah *V. probioticus* dengan hasil persentase 99,5% yaitu *V. probioticus*. Untuk mengetahui lebih jelas, hasil sequencing asam amino dari 16s rDNA pada *V. probioticus* dapat dilihat pada Lampiran 3.



**Gambar 3. Uji Hambat**

(sp1= *Acinetobacter*, sp2= *Proteus vulgaris*, sp3= *P. aeruginosa*, sp4= *Vibrio probioticus.*, sp5= *Bacillus licheniformis*, sp6= *Shigella sp.*, sp7= *V. alginolyticus*).

Morfologi bakteri *V. probioticus* diamati dengan teknik pewarnaan gram. Identifikasi bakteri dengan pewarnaan gram untuk mengetahui apakah biakan tergolong gram positif atau negatif. Hasil isolasi terhadap *V. probioticus* dari media BHI menunjukkan bahwa morfologi bakteri ini yaitu merupakan bakteri gram negatif dan berbentuk batang. Hal ini terlihat dari hasil pewarnaan yang berwarna merah. Warna ini didapatkan dari pewarna safranin yang terserap oleh dinding sel bakteri. Deskripsi bakteri diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x setelah dilakukan pewarnaan gram yang ditunjukkan pada Gambar 4.



**Gambar 4. Sel bakteri *Vibrio probioticus***

Menurut Taslihan (1986) dalam Winarti (2004), bahwa dalam proses pewarnaan gram, sel bakteri golongan gram positif memiliki afinitas yang besar terhadap kristal violet sehingga mampu mempertahankan cat tersebut dan tidak mengalami pelunturan dengan alkohol, sehingga dengan pengecatan safranin tidak akan terwarnai. Sebaliknya, bakteri golongan gram negatif yang memiliki afinitas rendah terhadap cat kristal violet akan luntur dengan pemberian alkohol sehingga dapat terwarnai oleh safranin.

Kedua jenis gram ini kemudian dibedakan berdasarkan warna sel setelah perlakuan pengecatan, untuk bakteri gram positif akan berwarna biru atau ungu sedangkan bakteri gram negatif akan berwarna merah. Perbedaan ini disebabkan oleh antara lain dinding sel bakteri gram positif lebih tebal serta kandungan lemak yang relatif lebih sedikit dibanding dengan bakteri gram negatif yang memiliki dinding sel lebih tipis serta kandungan lemak lebih banyak. Setelah didapatkan isolat bakteri, maka dilakukan perbanyakan bakteri pada media cair menggunakan BHI dan dikultur selama 48 jam pada *shaker bath*. Untuk bakteri *V. probioticus* media BHI yang digunakan sebanyak 100 ml.

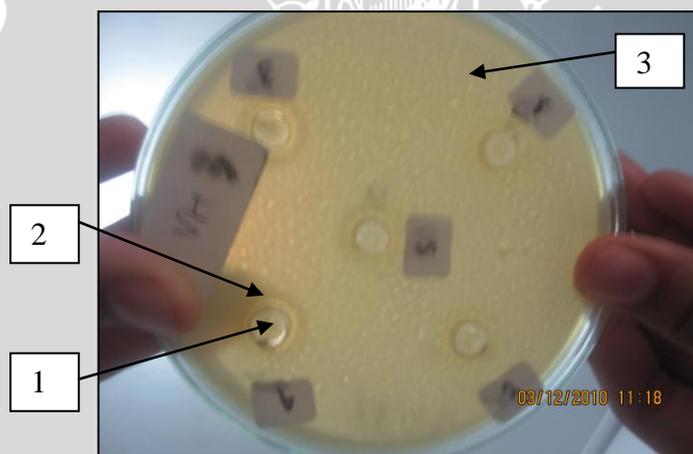
#### **4.3 Penentuan Konsentrasi Supernatan *V. probioticus* untuk Uji Tantang**

Penentuan konsentrasi supernatan *V. probioticus* yang digunakan untuk ujiantang didapatkan dari penelitian pendahuluan. Pada penelitian pendahuluan digunakan beberapa konsentrasi supernatan *V. probioticus* dengan menggunakan

pengenceran berseri, yaitu 0 % (kontrol), 12,5 %, 25 %, 50 % dan 100 %. Hasil pada penelitian pendahuluan antara lain dengan diameter zona hambat sebesar 6 mm pada konsentrasi 0 % (kontrol), 8 mm pada 12,5 %, 11 mm pada 25 %, 11,5 mm pada 50 %, dan 11 mm pada 100 %. Konsentrasi 100 % memberikan zona hambat yang sama dengan konsentrasi 25 %. Oleh karena itu, pada penelitian ini, konsentrasi yang digunakan yaitu 0% (kontrol), 12,5 %, 25 %, dan 50%. Sedangkan kepadatan bakteri uji yaitu *V. harveyi* yang digunakan yaitu  $10^8$  sel/ml.

#### 4.4 Diameter Daerah Hambatan Supernatan *Vibrio probioticus* Pada *Vibrio harveyi* Menggunakan *Well Diffusion Method* (Metode Difusi Sumuran)

Uji aktivitas penghambatan supernatant *V. probioticus* dengan *well diffusion method* (metode difusi sumuran) dapat dilihat pada Gambar 4. sebagai berikut.



**Gambar 5. Daerah Hambatan (Zona bening)**

Keterangan:

1. Isolat bakteri (supernatan)
2. Zona bening
3. Media Agar

Pada Gambar 5. dapat diketahui bahwa supernatant *V. probioticus* mampu menghambat aktivitas bakteri *V. harveyi*. Hal ini ditandai dengan terbentuknya daerah hambatan (zona bening) di sekitar lubang sumuran media bakteri, dimana daerah hambatan pada bagian tepi berwarna kuning pucat sedangkan pada daerah pusat berwarna keputihan dengan ukuran diameter sumuran sebesar 6 mm. Ukuran

zona hambat yang dihasilkan berdasarkan kekuatan zat antibakteri tersebut dalam menghambat bakteri uji seperti yang dijelaskan Agun (2008), bahwa setiap bahan antibakteri mempunyai kemampuan menghambat bakteri dalam konsentrasi tertentu. Dalam penelitian ini, dilakukan pengukuran diameter zona hambat pada masing-masing perlakuan. Daerah hambatan yang terbentuk dari beberapa konsentrasi supernatan terhadap pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Diameter Daerah Hambatan Pada Bakteri *Vibrio Harveyi***

Perlakuan (%)	Diameter Daerah Hambatan (mm)			Total	Rerata	Standar Deviasi
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
0	6,0	6,0	6,0	18,0	6,0	0
12,5	6,0	6,0	7,5	19,5	6,5	0,866
25	8,0	8,5	9,0	25,5	8,5	0,5
37,5	8,5	9,0	9,0	26,5	8,833	0,289
50	7,0	7,5	9,0	23,5	7,833	1,041
Total				113	-	

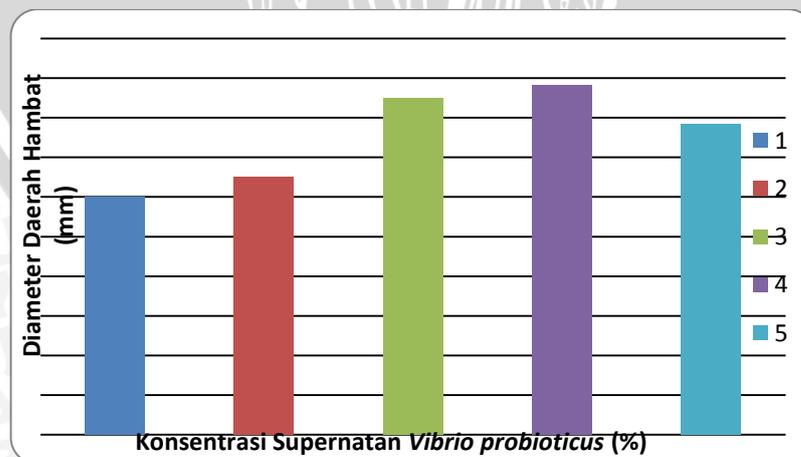
Pada Tabel 1. terlihat nilai rata-rata zona hambat tertinggi terdapat pada perlakuan C (37,5%) sebesar 8,333 mm, sedangkan zona hambat terkecil terdapat pada perlakuan A (0%) yaitu sebesar 6,0 mm atau tidak memiliki zona hambat. Hal ini karena pada kontrol yang digunakan hanya menggunakan aquadest murni, sehingga tidak mempengaruhi pertumbuhan *V. harveyi*. Namun pada konsentrasi 50% terjadi penurunan yang diduga konsentrasi 37,5 % merupakan konsentrasi optimal dalam penghambatan bakteri dengan menggunakan supernatan *V. probioticus* selain itu diduga supernatan bakteri *V. probioticus* hanya bersifat bakteristatik dimana hanya akan menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dan tidak membunuh sehingga pada konsentrasi 50 % tingkat penghambatan mulai lemah dan bakteri *V. harveyi* mulai tumbuh lagi. Dari nilai diameter hambatan yang paling kuat terjadi pada konsentrasi 37,5 % pada ulangan 2 dan ulangan 3. Sedangkan yang paling lemah pada kontrol. Hal ini sesuai dengan pembagian

kategori kekuatan aktivitas penghambatan menurut Liana (2010), bahwa kategori kekuatan penghambatan terhadap bakteri adalah sebagai berikut :

- a. Diameter daerah hambatan 5 mm atau kurang maka aktivitas penghambatannya dikategorikan lemah.
- b. Diameter 5-10 mm dikategorikan sedang.
- c. Diameter 10-19 mm dikategorikan kuat.
- d. 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat.

Dari hasil ujiantang di atas dapat disimpulkan bahwa supernatant *V. probioticus* pada dosis yang berbeda memberikan daya hambat yang lebih besar jika dibandingkan dengan kontrol (0%). Sebaliknya semakin tinggi konsentrasi supernatant *V. probioticus* yang diberikan maka daya hambat yang terbentuk semakin lebar. Hal ini disebabkan semakin tinggi konsentrasi dari perlakuan maka jumlah senyawa antibakterinya semakin banyak. Jawetz *et al.*, (1982), menjelaskan bahwa semakin tinggi konsentrasi antibakteri yang digunakan, maka kemampuan untuk membunuh bakteri semakin cepat.

Peningkatan diameter daerah hambatan akan semakin tinggi dengan semakin meningkatnya konsentrasi supernatant *V. probioticus* hal itu dapat dilihat dari diagram batang hubungan antara konsentrasi supernatant *V. probioticus* dengan diameter daerah hambatan yang tersajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Diagram Batang Hubungan antara Konsentrasi Supernatant (%) dengan Diameter Daerah Hambatan (mm)

Pada Gambar 6 terlihat variasi diameter daerah hambatan pada setiap perlakuan konsentrasi supernatan yang berbeda. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka diameter daerah hambatan yang diperoleh juga semakin besar. Hal ini disebabkan semakin tinggi konsentrasi dari perlakuan maka jumlah senyawa antibakterinya semakin banyak. Jika jumlah senyawa antibakteri semakin tinggi, maka daya hambat terhadap bakteri akan semakin besar. Akan tetapi pada konsentrasi 50% terlihat adanya penurunan terhadap besarnya diameter hambat, hal ini diduga pada konsentrasi tersebut kemampuan bakteri penghambat telah mengalami penurunan. Walaupun telah dikatakan bahwa semakin besar konsentrasi maka jumlah senyawa antibakteri juga semakin tinggi, tetapi dimungkinkan juga telah terjadi resistensi pada bakteri yang telah dihambat. Sehingga kemampuan daya hambat bakteri *V. probioticus* terhadap bakteri *V. harveyi* telah menurun. Hal lain diduga bahwa ekstraseluler yang dimiliki *V. probioticus* terdapat sedikit kesamaan dengan *V. harveyi*.

Berdasarkan data diatas, diduga supernatan *V. probioticus* memiliki zat antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan *V. harveyi*. Zat antibakteri adalah senyawa yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Zat antibakteri dapat bersifat membunuh mikroorganisme (*microbicidal*) atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme (*microbiostatik*) (Pradhika, 2008). Menurut Prasad *et al.*, (2005), bakteriosin baik yang dilaporkan dari bakteri Gram-negatif yaitu *E. coli*, disebut sebagai colicins. Sebagian kecil bakteriosin telah diidentifikasi pada organisme Gram-negatif lainnya, misalnya, pyocins dalam *Pseudomonas* sp. (Yakub, 1954), vibriocin dalam "vibrio koma". Colicins dapat berperan sebagai bakteriosin pada bakteri Gram-negatif lainnya. Mereka memiliki karakteristik umum tertentu, seperti menjadi plasmid yang dikodekan dan saat pelepasan, biasanya melibatkan lisis produsen, meskipun ada pengecualian, mekanisme lisis tidak jelas Selanjutnya, produksi colicins kebanyakan dimediasi oleh regulon SOS, dan secara umum dapat merusak agen DNA, seperti mitomycin C

dan UV. Produksi bakteriosin dianggap sebagai salah satu sistem pertahanan yang ditampilkan oleh bakteri dan mungkin berfungsi untuk mediasi intra-spesifik atau interaksi di tingkat populasi yang kemungkinan oleh adanya persaingan antagonisme pada strain yang sensitif.

Zat antibakteri dapat secara sintesis atau biologis. Contoh antibakteri biologi antara lain hormon timus, limfokin, interferon, antibodi monoklonal, komponen dari mikroorganisme, seperti bakteri dan jamur serta zat ekstrak dari tumbuhan. Sedangkan antibakteri sintetik antara lain levamisol, isoprinosin serta muramil peptidase (Dianasari, 2006).

Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat berupa perusakan dinding sel. Hal ini dilakukan dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk, perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan keluarnya bahan makanan dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat,, penghambatan kerja, enzim, dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein (Pelczar dan Chan 1988).

Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh pemberian konsentrasi supernatan yang berbeda terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi*, maka dilakukan analisis keragaman (Lampiran 4) dengan hasil seperti pada Tabel 2.

**Tabel 2. Analisis Keragaman/Sidik Ragam Bakteri *V. probioticus* Pada Pertumbuhan *Vibrio harveyi***

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	8,410	2,102	1,468 <sup>ns</sup>	3,48	5,99
Acak	10	14,323	1,432			
Total	14					

Keterangan : ns = *non significant* (Tidak berbeda nyata)

Dari hasil analisis sidik ragam diketahui bahwa nilai F hitung ternyata lebih kecil dari F 5% dan F 1% sehingga diketahui bahwa nilai daerah hambat pada perlakuan tidak berbeda nyata yang berarti menerima  $H_0$  dan menolak  $H_1$  sehingga tidak perlu dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT).

Berdasarkan Tabel sidik ragam di atas diketahui bahwa perbedaan penggunaan konsentrasi supernatan *V. probioticus* tidak berpengaruh yang nyata terhadap pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Salah satu parameter pertumbuhan bakteri pada penelitian ini adalah besarnya daerah hambatan *V. probioticus* yang berarti bahwa tidak ada pengaruh yang nyata dari penggunaan perbedaan dosis supernatant *V. probioticus* terhadap pertumbuhan *V. harveyi*. Walaupun dari data penelitian dapat dilihat adanya perbedaan namun jika dilihat secara perhitungan statistik perlakuan tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor yang diduga yaitu interval atau jarak konsentrasi yang digunakan terlalu jauh, dan juga keadaan sekitar yang memungkinkan terjadinya kontaminasi.

#### 4.5 Parameter Penunjang

Parameter penunjang yang digunakan di dalam penelitian ini adalah suhu inkubator dan pH media. Suhu inkubator sebesar 37,5 °C. Menurut Bergey's (2000), bakteri *V. harveyi* dapat hidup pada kisaran suhu yang sangat luas antara 20 °C dan optimum pada suhu 30 °C. Suhu yang diterapkan selama masa inkubasi dapat mempengaruhi laju pertumbuhan bakteri, karena mempengaruhi laju semua reaksi seluler. Selain itu, suhu juga dapat mempengaruhi pola metabolisme, persyaratan nutrisi dan komposisi sel bakteri (Dwidjoseputro, 1989). Sedangkan untuk pH media didapatkan sebesar 7, kondisi ini baik untuk pertumbuhan bakteri. Selain nutrisi yang memadai, kondisi lain harus dipenuhi untuk menumbuhkan bakteri. Media harus mempunyai pH yang tepat yaitu tidak terlalu asam dan tidak terlalu basa. Menurut Volk dan Wheeler (1993), pada dasarnya tidak satupun bakteri dapat tumbuh baik pada pH lebih dari 8. Sebagian besar bakteri patogen tumbuh baik pada pH netral (pH = 7) atau pada pH yang sedikit basa.

Dalam penelitian mikrobiologi, bahan antibakteri yang diujikan biasanya digunakan dalam bentuk konsentrasi sehingga menyebabkan zat antibakteri yang

terkandung dalam suatu bahan tiap perlakuan berbeda-beda. Ada yang tinggi juga ada yang rendah. Akan tetapi tinggi rendahnya kandungan zat antibakteri dalam suatu bahan dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri patogen. Sehingga dapat dijadikan tolok ukur keefektifan kerja dari zat antimikroba tersebut untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Agun, 2008).



## 5. KESIMPULAN

### 5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian “Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Supernatan *Vibrio probioticus* Sebagai Inhibitor Terhadap *Vibrio Harveyi* Secara In Vitro” dapat disimpulkan sebagai berikut:

- Supernatan *Vibrio probioticus* mempunyai pengaruh terhadap aktivitas penghambatan *V. harveyi* karena mampu menghambat *V. harveyi* dengan terbentuknya daerah hambatan (zona hambat) di sekitar lubang sumuran, namun tidak memberikan pengaruh yang nyata dalam perhitungan sidik ragam.
- Rata-rata diameter hambatan pada bakteri *V. harveyi* untuk perlakuan A (12,5 %) adalah 6,5 mm; perlakuan B (25 %) rata-rata diameter daerah hambatannya sebesar 8,5 mm; perlakuan C (37,5 %) rata-ratanya 8,833 mm; perlakuan D (50%) rata-ratanya 7,833 mm; dan perlakuan K (0%) rata-rata diameter hambatannya sebesar 6,0 mm.
- Konsentrasi maksimal *V. probioticus* yang mampu menghambat *V. harveyi* yaitu 37,5 % dengan rata-rata diameter 8,833 mm.

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dapat di sarankan perlu dilakukan penelitian lanjutan ujiantang *V. probioticus* dengan konsentrasi yang lebih kecil dan juga penelitian aktivitas penghambatan *V. harveyi* dengan supernatan *V. probioticus* secara *In vivo* terhadap organisme yang terserang *V. harveyi*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agun. 2008. **Daya Antimikroba Berbagai Konsentrasi Yogurt terhadap Bakteri *Salmonella typhi* secara *In vitro***. <http://one.indoskripsi.com>. Diakses tanggal 14 Februari 2010.
- Agung, M. U. K. 2007. **Penelurusan Efektifitas Beberapa Bahan Alam Sebagai Kandidat Antibakteri Dalam Mengatasi Penyakit Vibriosis Pada Udang Windu (*Suatu Kajian Kepustakaan*)**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran. Jatinangor.
- Aisah, Nur. 2010. **Formulasi Salep Minyak Atsiri Rimpang Temu Glenyeh (*Curcuma Soloensis*. Val) Dengan Basis Larut Air Dan Basis Lemak: Sifat Fisik Dan Aktivitas Antijamur *Candida Albicans* Secara *In Vitro***. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Austin, B. and Austin, A. D. 2007. **Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed And Wild Fish**. Praxis Publishing. Chichester, UK.
- Balca'zar, J., Blas, I., Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., dan Mu'zquiz, J. 2006. **The role of probiotics in aquaculture**. Laboratory of Fish Pathology, University of Zaragoza, c/. Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain. Environmental Science and Occupational Safety Lab, Massachusetts Bay Community College, Wellesley, MA, USA.
- Bauman, P.A.L, Furniss and I. V. Lee. 1984. **Facultative Anaerobic Gram Negative Rods : Genus I *Vibrio***. In : Krieg N. R and Holt J.G (Ed). *Bergey's Manual of Sistematic Bacterology*. Williams and Wilkins Baltimore. USA. P. 518-538.
- Bergey's. 2000. **Manual of Determinative Bacterology. 9<sup>th</sup> Edition**. Williams and Wilkins A wolters Klower Company. Philadelphia. 787 hal.
- Bokau, Rietje J. M. dan Febriani, D. 2008. **Peranan Probiotik Dalam Meningkatkan Hasil Pembenihan Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy* )**. Program Studi Budidaya Perikanan Politeknik Negeri Lampung. Jl. Soekarno-Hatta Rajabasa, Bandar Lampung
- Bonang, G dan Koeswardono E. S. 1994. **Mikrobiologi Kedokteran. Untuk Laboratorium dan Klinik**. Penerbit PT Gramedia Pustaka. Jakarta. 197 hal.
- Budyanti, A. 2009. **Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Dan Bioautografinya**. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Dianasari. 2006. **Penting atau Tidak Pemberian Imunostimulan**. <http://dianasari2006.multiply.com/journal/item/>. Diakses tanggal 15 Februari 2010
- Dwijoseputro, D. 1989. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Penerbit Djambatan. Jakarta.

- Dwijoseputro, D. 2003. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Penerbit Djambatan. Jakarta. 214 hal.
- Fahry, bimantara. 2009. **Bakteri Pathogen Pada Budidaya Perikanan *Vibrio alginolyticus***. <http://elfahrybimantara.blogspot.com>. Diakses tanggal 20 Juli 2010.
- Fadjar, M ., Kilawati, Y., Ni'matuzahro, Awaludin, A., and Kuhn, H. 2010. **Screening And 16s Rdna Identification Of *Vibrio Harveyi's* Inhibitor Bacteria From Traditional Shrimp Ponds In Bangil, East Java, Indonesia**. In Progress.
- Fajariah, I. N. 2009. **Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae* Serta Bioautografinya**. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Feliatra. 1999. **Identifikasi Bakteri Pathogen (*Vibrio sp*) di Perairan Nongsa Batam Propinsi Riau**. **Jurnal Natur Indonesia Volume II**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau. Riau. 28-33 hal. [www.unri.ac.id/jurnal/jurnal\\_natur/vol2/5.pdf](http://www.unri.ac.id/jurnal/jurnal_natur/vol2/5.pdf).
- Gasperz, V. 1991. **Metode Perencanaan Percobaan**. CV Armico. Bandung. 472 hal.
- Handajani, H. dan Samsundari, S. 2005. **Parasit dan Penyakit Ikan**. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang. 13-17 hal
- Jawetz, E., J. L. Manik dan E. A Edelberg. 1982. **Mikrobiologi untuk Profesi Kedokteran**. CV. E.G.C. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 845 hal.
- Kordi, K. M. G.H. 2001. **Usaha Pembesaran Ikan Kerapu di Tambak**. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 115 hal.
- Liana, I. 2010. **Aktivitas Antimikroba Fraksi Dari Ekstrak Metanol Daun Senggani (*Melastoma candidum* D. Don) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhimurium* Serta Profil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Teraktif**. Jurusan Biologi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Nazir, M. 1988. **Metode Penelitian**. Ghalia Indonesia. Jakarta. 662 hal.
- Nurhayati, T., Suhartono, M.T., Nuraida, L., Dan Poerwanto, S. B. 2006. **Karakterisasi Awal Inhibitor Protease dari Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Asal Pulau Panggang, Kepulauan Seribu. Preliminary Characterization of Protease Inhibitor from Bacteria-Associated with Sponge from Panggang Island, Seribu Islands**. Departemen Teknologi Hasil Perairan, FPIK, Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fateta, Kampus Darmaga, Bogor 16680 dan Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144.
- Nurhidayah, M. Atmomarsono, M. I. Madeali. 2000. **Penyebaran Bakteri *Vibrio* di Pertambakan Udang Windu (*Penaeus monodon*) Sulawesi Selatan**. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Perikanan. Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta. 7: 214-220.

- Pelczar, M. I. dan Chan, E. C. S. 1986. **Dasar-dasar Mikrobiologi. Jilid 1.** Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 441 hal.
- Pradhika, Indra. 2008. **Mikro-Ba Nget.** [www.Ekmon-saurus.blogspot.com](http://www.Ekmon-saurus.blogspot.com). diakses tanggal 13 Februari 2010.
- Prajitno, Arif. 2007. **Penyakit Ikan-Udang Bakteri.** Universitas Malang Press. Malang.
- Prasad, S., Morris, P. C., Hansen, R., Meaden, P. G., Austin, B. 2005. **A novel bacteriocin-like substance (BLIS) from a pathogenic strain of *Vibrio harveyi*.** School of Life Sciences, John Muir Building, Heriot-Watt University, Riccarton, Edinburgh. EH14 4AS, UK.
- Rattanachuy, P., Kantachote, D. and Suintanalert, P. **Selection of proteolytic bacteria with ability to inhibit *Vibrio harveyi* during white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultivation, Songklanakar J. Sci. Technol., 2007, 29(2) : 235-243.** Assoc. Prof., Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.
- Rindiastuti, Yuyun. 2008. **Aspek Immunologi Probiotik.** Fakultas Kedokteran UNS Solo. Solo.
- Rukyani, Akhmad. 1999. **Beberapa Jenis Penyakit Sebagai Kendala Utama Budidaya Udang dan Cara Pengendaliannya.** Badan Litbang Pertanian.
- Sugita, H., Matsuo, N., Hirose, Y., Iwato, M., dan Deguchi, Y. 1997. **Applienand Environmental Microbiology. American Society for Microbiology *Vibrio* sp. Strain NM 10, Isolated from the Intestine of a Japanese Coastal Fish, Has an Inhibitory Effect Against Pasteurellapiscicida.** Department of Marine Science and Resources. Nihon University, Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252. Japan.
- Tompo, A dan E. Susianingsih. 2004. **Isolasi dan Karakterisasi Bakteri *Vibrio* pada Tambak Udang yang Menguntungkan Immunostimulan untuk Pengendalian Penyakit.** Prosiding Pengendalian Penyakit Pada Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity. Purwokerto. 1-6 hal.
- Viramedika. 2008. **Membedakan Bakteri Gram Positif dan Negatif.** <http://scrib.com/doc/25146430>. Diakses 7 Februari 2010
- Wanasuria, S. 2010. **Probiotik Akuakultur.** <http://agritekno.com/probiotik/103-probiotik-akuakultur.html>. diakses tanggal 25 Desember 2010.
- Winarti S., 2004. **Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Nimba (*Azadirachta Indica*) Dengan Konsentrasi Yang Berbeda Terhadap Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *Vibrio harveyi* Secara In Vitro.** Skripsi Program S<sub>1</sub>, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan – Universitas Brawijaya Malang.

Lampiran 1. Hasil Identifikasi *Vibrio harveyi*



KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN

LABORATORIUM PENGUJI

BALAI KARANTINA IKAN KELAS I JUANDA



Jl. Raya Bandar Udara Ir. H. Juanda No. 23, Sidoarjo, 61254  
Telp/fax : 031 - 8688099 - 8688118 - 8678471 E-mail : bkijuanda@yahoo.co.id

**LAPORAN HASIL UJI**

Report of Analysis

No.0137//BKIJ/IV/2010

KODE SAMPEL :0137  
*Sample Code*  
NAMA/JENIS SAMPEL :isolat  
*Type of Sample*  
NAMA PELANGGAN :Ika Dwi  
*Customer*  
ALAMAT :Mahasiswa Unibraw Malang  
*Address*  
TANGGAL PENERIMAAN :01 April 2010  
*Received Date*  
TANGGAL ANALISA :01-04 April 2010  
*Date of Analysis*  
PARAMETER ANALISA :Identifikasi spesies Bakteri  
*Analysis of Parameters*  
SPESIFIKASI METODE :Konvensional  
*Method Specification*  
HASIL ANALISA :

NO	KODE SAMPEL <i>Sample Code</i>	HASIL IDENTIFIKASI <i>Result Identification</i>
1.	0137	<i>Vibrio harveyi</i>

*Test Result*

CATATAN

Note

: Analisa dengan Metode Konvensional

*Conventional method analysis*

Surabaya, 21 Januari 2011

Penanggung jawab Lab BAKteriologi,



Laminem, S.Pi.MP

NIP. 19701206 199203 2 002



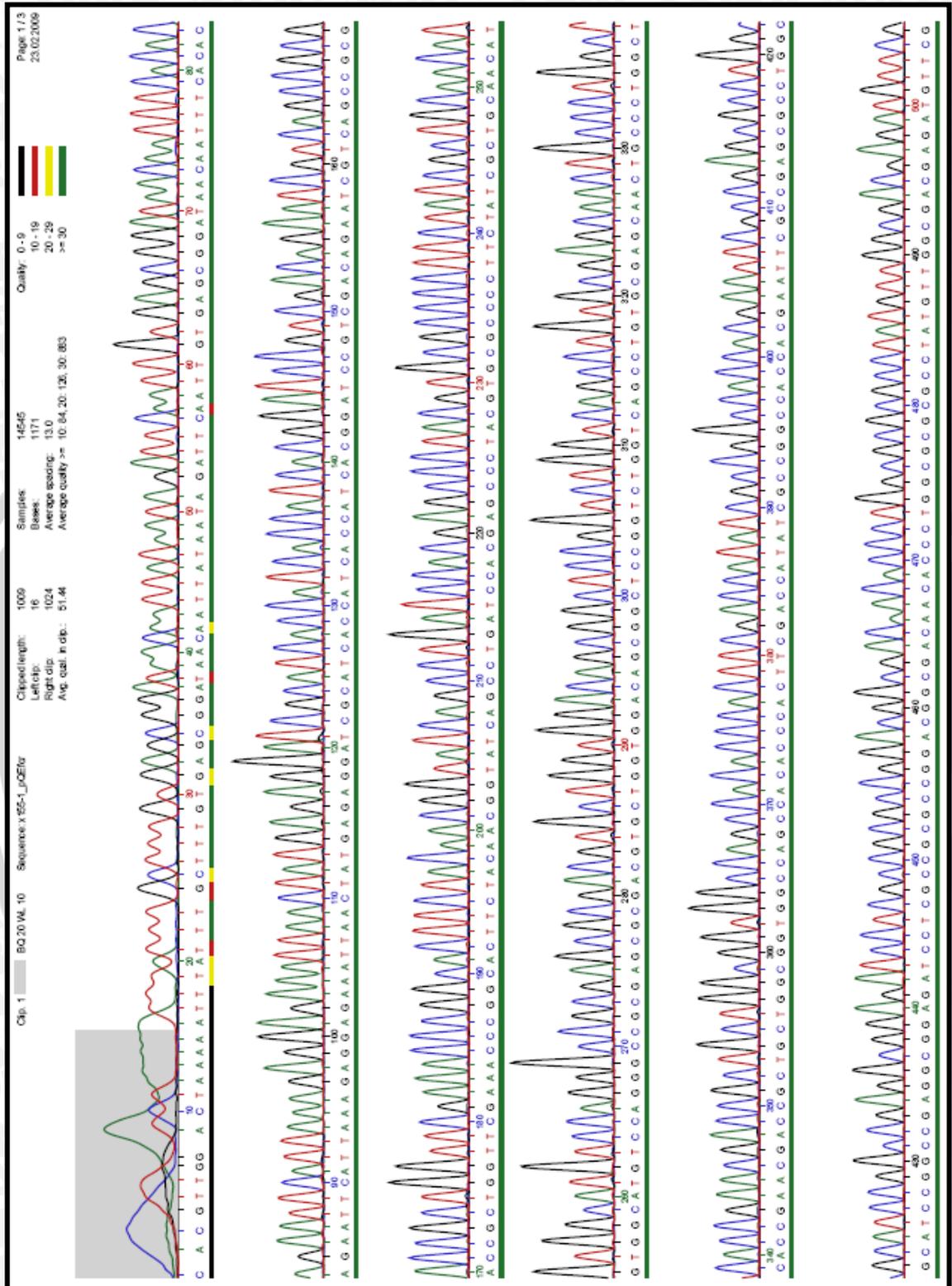
Lampiran 2. Uji Kimia dan Morfologi Strain Bakteri dalam Air dan Sedimen Kolam Udang

No.	Test	Bacteria							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Oxidase	-	+	-	+	+	-		
2.	Motility	-	-	-	+	+	-		
3.	Nitrate	-	+	-	-	+	-		
4.	Lysine	+	+	-	+	+	-		
5.	Ornithine	-	-	-	+	-	-		
6.	H <sub>2</sub> S	-	+	-	-	-	-		
7.	Glucose	+	+	+	+	+	+		
8.	Mannitol	-	+	+	-	+	+		
9.	Xylose	+	+	-	+	+	+		
10.	ONPG	-	+	-	+	+	-		
11.	Indole	-	-	+	-	-	-		
12.	Urease	-	+	+	-	-	-		
13.	V-P	-	-	-	-	-	+		
14.	Citrate	-	-	+	-	+	-		
15.	TDA	-	-	+	-	-	-		
16.	Gelatin	-	-	-	-	-	-		
17.	Malonate	-	-	-	-	+	-		
18.	Inositol	-	-	-	-	-	-		
19.	Sorbitol	-	-	-	-	-	-		
20.	Rhamnose	-	-	-	-	-	-		
21.	Sucrose	-	-	-	-	-	+		
22.	Lactose	-	-	-	-	-	-		
23.	Arabinose	-	-	-	-	+	-		
24.	Adonitol	-	-	-	-	-	-		
25.	Raffinose	-	-	-	-	-	-		
26.	Salicin	-	-	-	-	-	-		
27.	Arginine	-	-	-	-	-	-		

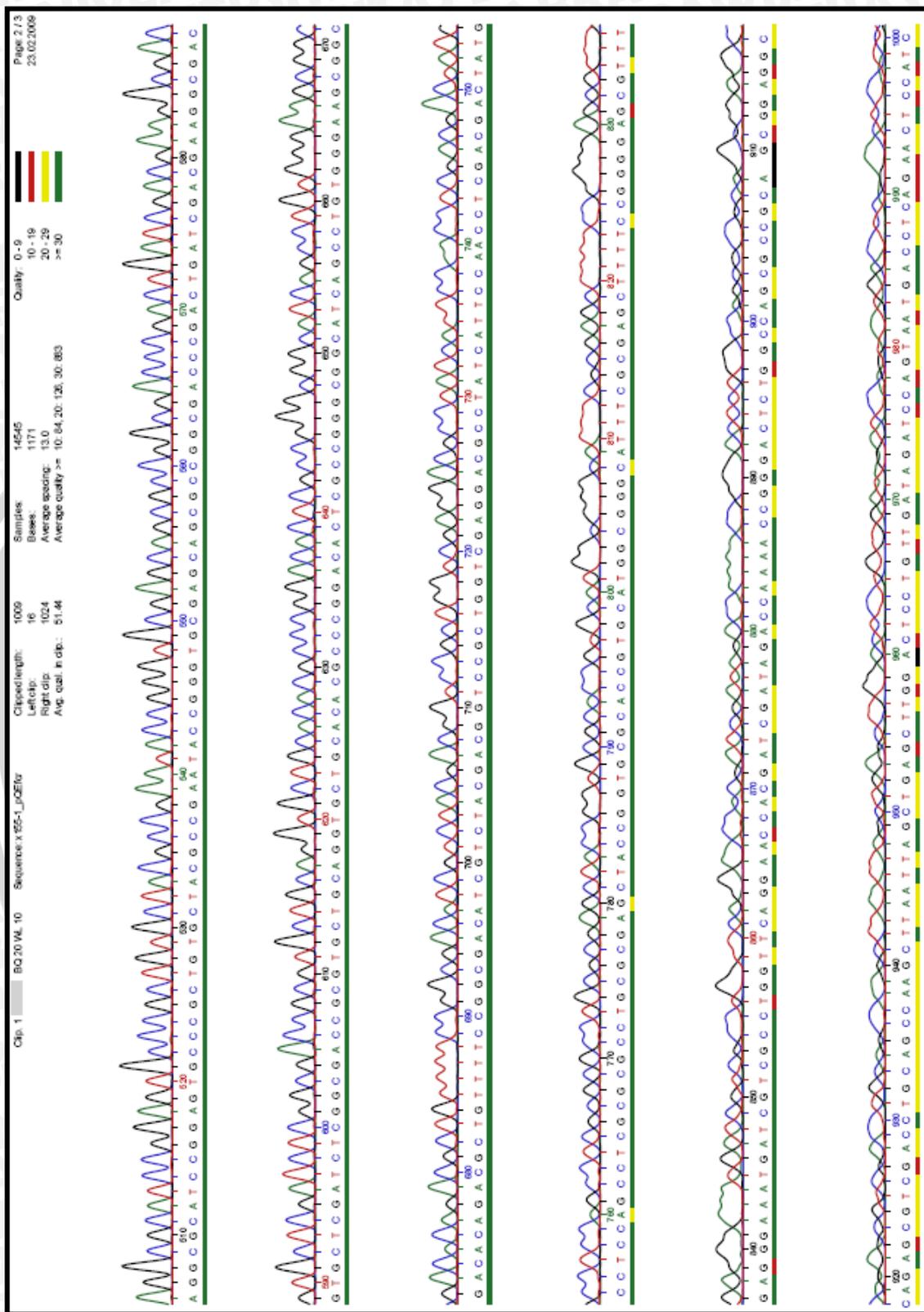
Note: 1= *Acinetobacter baumannii*, 2=*Vibrio* sp., 3= *Proteus rettgeri*, 4= *V. parahaemoliticus*, 5 = *Pseudomonas aeruginosa*, 6= *Bacillus licheniformis*, 7= *Vibrio alginoliticus*, 8= *Shigella* sp.



Lampiran 3. Hasil Sequencing Asam amino 16s rDNA pada *Vibrio probioticus*



Lampiran 3. Lanjutan





#### Lampiran 4. Analisis Data

Tabel 1. Diameter Daerah Hambatan Pada Bakteri *Vibrio Harveyi*

Perlakuan	Diameter Daerah Hambatan (mm)			Total	Rerata
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
K	6,0	6,0	6,0	18,0	6,0
A	6,0	6,0	7,5	19,5	6,5
B	8,0	8,5	9,0	25,5	8,5
C	8,5	9,0	9,0	26,5	8,833
D	7,0	7,5	9,0	23,5	7,833
Total				113	-

#### ❖ Perhitungan Jumlah Kuadratik

$$\text{Faktor koreksi} = G^2/n$$

$$= 113^2/3 \times 5$$

$$= 851,267$$

$$\begin{aligned} \text{❖ JK Total} &= (K)^2 + (A1)^2 + (A2)^2 + \dots + (D3)^2 - FK \\ &= (6)^2 + (6)^2 + (6)^2 + (8)^2 + (8,5)^2 + (9)^2 + (8,5)^2 + (9)^2 + (9)^2 + (7)^2 + \\ &\quad (7,5)^2 + (9)^2 - 851,267 \\ &= 22,733 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{❖ JK Perlakuan} &= \{(\Sigma K)^2 + (\Sigma A)^2 + (\Sigma B)^2 + (\Sigma C)^2 + (\Sigma D)^2\} / 3 - FK \\ &= \{(18)^2 + (19,5)^2 + (25,5)^2 + (25,6)^2 + (23,5)^2\} / 3 - 851,267 \\ &= 8,41 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{❖ JK Acak} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 22,733 - 8,41 \\ &= 14,323 \end{aligned}$$

#### ❖ Tabel Analisis Sidik Ragam Bakteri *Vibrio probioticus* Pada Pertumbuhan *Vibrio harveyi*

Sumber keragaman	Db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	8,41	2,102	1,468 <sup>ns</sup>	3,48	5,99
Acak	10	14,323	1,432			
Total	14					

Keterangan : ns = tidak berbeda nyata

#### Lampiran 4. Lanjutan

Karena  $F$  hitung  $< F$  1% atau  $1,468 < 3,48$  maka perlakuan pemberian supernatan *Vibrio* sp. dengan dosis berbeda tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi*.

#### ❖ Perhitungan Standar Deviasi

Perlakuan (%)	Diameter Daerah Hambatan (mm)			Rata-rata	Standar Deviasi
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
0	6,0	6,0	6,0	6,0	0
12,5	6,0	6,0	7,5	6,5	0,866
25	8,0	8,5	9,0	8,5	0,5
37,5	8,5	9,0	9,0	8,833	0,289
50	7,0	7,5	9,0	7,833	1,041

▪ Nilai standar deviasi konsentrasi 0% = 0

▪ Nilai standar deviasi konsentrasi 12,5 % :

$$\rightarrow 6,0 - 6,5 = -0,5 \rightarrow (-0,5)^2 = 0,25$$

$$6,0 - 6,5 = -0,5 \rightarrow (0,5)^2 = 0,25$$

$$7,5 - 6,5 = 1,0 \rightarrow (1,0)^2 = 1$$

$$\rightarrow (0,25 + 0,25 + 1)/2 = 0,75$$

$$\rightarrow \text{Standar deviasi} = \sqrt{0,75} = 0,866$$

▪ Nilai standar deviasi konsentrasi 25 % :

$$\rightarrow 8,0 - 8,5 = -0,5 \rightarrow (-0,5)^2 = 0,25$$

$$8,5 - 8,5 = 0 \rightarrow (0)^2 = 0$$

$$9,0 - 8,5 = 0,5 \rightarrow (0,5)^2 = 0,25$$

$$\rightarrow (0,25 + 0 + 0,25)/2 = 0,25$$

$$\rightarrow \text{Standar deviasi} = \sqrt{0,25} = 0,5$$

#### Lampiran 4. Lanjutan

- Nilai standar deviasi konsentrasi 37,5 % :

$$\rightarrow 8,5 - 8,833 = -0,333 \rightarrow (-0,333)^2 = 0,110889$$

$$9,0 - 8,833 = 0,167 \rightarrow (0,167)^2 = 0,027889$$

$$9,0 - 8,833 = 0,167 \rightarrow (0,167)^2 = 0,027889$$

$$\rightarrow (0,110889 + 0,027889 + 0,027889)/2 = 0,0833335$$

$$\rightarrow \text{Standar deviasi} = \sqrt{0,0833335} = 0,289$$

- Nilai standar deviasi konsentrasi 50 % :

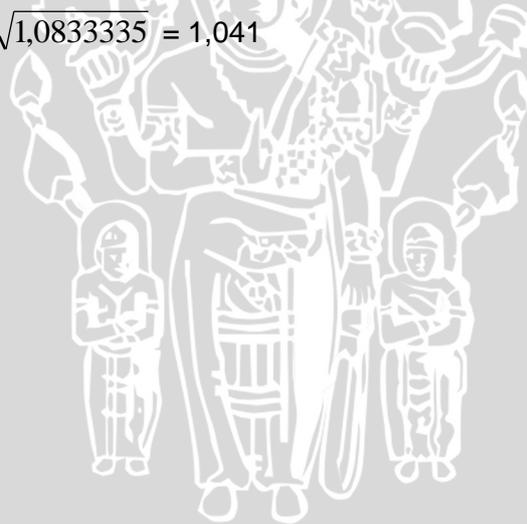
$$\rightarrow 7,0 - 7,833 = -0,833 \rightarrow (-0,833)^2 = 0,693889$$

$$7,5 - 7,833 = 0,333 \rightarrow (0,333)^2 = 0,110889$$

$$9,0 - 7,833 = 1,167 \rightarrow (1,167)^2 = 1,361889$$

$$\rightarrow (0,693889 + 0,110889 + 1,361889)/2 = 1,0833335$$

$$\rightarrow \text{Standar deviasi} = \sqrt{1,0833335} = 1,041$$



Lampiran 5. Gambar Alat dan Bahan



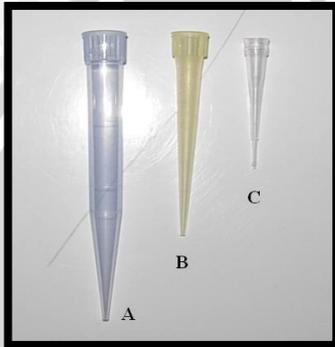
a. Timbangan Digital



b. Beaker Glass



c. - A. Falcon 15 cc  
- B. Eppendorf



d. - A. Blue tip  
- B. Yellow tip  
- C. White tip



e. Pipet Mikro 50  $\mu$ l



f. Erlenmeyer



g. Autoklaf



h. Bunsen



i. Sentrifugasi

Lampiran 5. Lanjutan



j. Media BHI



k. Supernatan *Vibrio probioticus*



## Lampiran 6. Perhitungan Pengenceran Supernatan

Untuk membuat pengenceran supernatan dengan volume 2 ml

Pengenceran menggunakan Rumus :

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

1. Konsentrasi 12,5 %

$$12,5 \% \cdot 2 \text{ ml} = 100 \% \cdot V_1$$

$$V_1 = \frac{12,5\% \times 2\text{ml}}{100\%}$$

$$= 0,25 \text{ ml}$$

2. Konsentrasi 25 %

$$25 \% \cdot 2 \text{ ml} = 100 \% \cdot V_1$$

$$V_1 = \frac{25\% \times 2\text{ml}}{100\%}$$

$$= 0,5 \text{ ml}$$

3. Konsentrasi 37,5 %

$$37,5 \% \cdot 2 \text{ ml} = 100 \% \cdot V_1$$

$$V_1 = \frac{37,5\% \times 2\text{ml}}{100\%}$$

$$= 0,75 \text{ ml}$$

4. Konsentrasi 50 %

$$50 \% \cdot 2 \text{ ml} = 100 \% \cdot V_1$$

$$V_1 = \frac{50\% \times 2\text{ml}}{100\%}$$

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

