PENGARUH PERBEDAAN KONSENTRASI SUPERNATAN *Vibrio sp.* SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK TERHADAP AKTIVITAS PENGHAMBATAN *Aeromonas hydrophila* SECARA IN-VITRO

MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

BUDIDAYA PERAIRAN

LAPORAN SKRIPSI

OLEH :

NENY DWI LESTARI

0610850052

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

MALANG

2011

repository.ub.ac.id

PENGARUH PERBEDAAN KONSENTRASI SUPERNATAN *Vibrio sp.* SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK TERHADAP AKTIVITAS PENGHAMBATAN *Aeromonas hydrophila* SECARA IN-VITRO

Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mendapatkan Gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya

OLEH :

NENY DWI LESTARI

0610850052

Menyetujui,

Dosen Penguji	**Dosen Pembimbing I**
(Prof. Ir. MARSOEDI, Ph. D.)	**(Ir. MOHAMMAD FADJAR, MSc.)**
NIP. 19460320 197303 1 001	**NIP.19621014 198701 1 001**
Tanggal :	**Tanggal :**
Dosen Penguji II	**Dosen Pembimbing II**
(Ir. ANIK MARTINA HARIATI, MSc.)	**(Dr. Ir. SRI ANDAYANI, MS.)**
NIP. 19610310 198701 2 001	**NIP : 19611106 198602 2 001**
Tanggal :	**Tanggal:**

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, MS)
NIP. 19600322 198601 1 001
Tanggal :

repository.ub.ac

RINGKASAN

NENY DWI LESTARI. Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Supernatan *Vibrio* sp. Sebagai Kandidat Probiotik Terhadap Aktivitas Penghambatan *Aeromonas hydrophila* Secara In-Vitro (di bawah bimbingan **Ir. MOHAMMAD FADJAR, MSc.** dan **Dr. Ir. SRI ANDAYANI, MS.**).

Bakteri A. *hydrophila* merupakan bakteri virulen pada budidaya air tawar yang dapat menimbulkan berbagai penyakit bagi organisme yang dibudidayakan. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas* spp. bersifat oportunis yaitu mampu berkembang menjadi ganas pada keadaan optimum. Keadaan kandungan oksigen rendah, suhu tinggi, akumulasi bahan organik atau sisa-sisa metabolisme ikan pada kepadatan tinggi sangat menunjang menyebarnya bakteri ini. Bakteri *A. hydrophila* dapat menyerang semua jenis ikan air tawar dengan jenis penyakitnya disebut *Motil Aeromonas Septicaemia* (MAS) atau disebut juga *haemorragic septicaemia*. Ikan yang terserang bakteri ini memiliki ciri-ciri sebagai berikut warna tubuh berubah menjadi agak gelap, kulitnya menjadi kesat dan timbul pendarahan yang selanjutnya akan menjadi borok (*haemorragic*), kemampuan berenangnya akan menurun dan sering berenang di permukaan air karena insangnya rusak sehingga sulit bernapas, sering terjadi pendarahan pada organ bagian dalam seperti hati, ginjal maupun limpa, seluruh siripnya rusak dan insangnya menjadi berwarna keputih-putihan, mata rusak dan agak menonjol.

Pengendalian penyakit yang disebabkan bakteri *A. hydrophila* dapat dilakukan dengan memanfaatkan bakteri *Vibrio* sp. sebagai kandidat probiotik dalam lingkungan perairan. Pemanfaatan bakteri antagonis sebagai agen biokontrol akan semakin penting dari segi ekosistem akuakultur, mengurangi dan bahkan menghilangkan penggunaan antibiotik sehingga tercipta sistem budidaya yang ramah lingkungan. Penggunaan *Vibrio* sp. yang dibentuk menjadi supernatan sebagai kandidat probiotik diduga menghasilkan beberapa komponen antimikroba ekstraseluler. Syarat penggunaan probiotik diantaranya adalah: (1) menguntungkan inangnya, (2) mampu hidup walaupun tidak tumbuh di intestinum inang, (3) harus dapat hidup dan bermetabolisme di lingkungan usus (4) resisten pada suhu rendah dan asam organik, (5) dapat disiapkan sebagai produk sel hidup dalam skala besar (industry), (6) dapat menjaga stabilitas dan sintasannya untuk waktu yang lama baik dalam penyimpanan maupun di lapangan, (6) tidak menghasilkan senyawa toksik. Mekanisme kerja antimikroba dibagi menjadi beberapa cara yaitu: (1) hambatan sintesis dinding sel, (2) perubahan permeabilitas membran sel atau penghambatan pengangkutan aktif melalui membran sel, (3) hambatan sintesis protein, (4) hambatan terhadap metabolisme mikroba, serta (5) hambatan sintesis asam nukleat sel.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, pada bulan November 2010. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan konsentrasi penggunaan *Vibrio* sp. sebagai kandidat probiotik yang berupa supernatan terhadap aktivitas penghambatan bakteri *A. hydrophila*. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi dalam pencegahan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* dengan menggunakan *Vibrio* sp. sebagai kandidat probiotik dalam budidaya perairan.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen, sedangkan rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL),

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

dengan menggunakan lima perlakuan dan tiga kali ulangan. Perlakuan tersebut meliputi konsentrasi supernatan *Vibrio* sp. yaitu 0%, 12,5%, 25%, 37,5% dan 50%. Parameter utama dalam penelitian ini adalah diameter daerah hambat *Vibrio* sp. terhadap aktivitas penghambatan bakteri *A. hydrophila.* Sedangkan, parameter penunjang dalam penelitian ini adalah pH media dan suhu inkubator.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi supernatan *Vibrio* sp. memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap aktivitas penghambatan *A. hydrophila* untuk perlakuan K (0%) nilai rata-rata diameter daerah hambat yaitu 6 mm, perlakuan A (12,5%) nilai rata-rata diameter daerah hambat yaitu 7,667 mm, perlakuan B (25%) dengan rata-rata diameter daerah hambat sebesar 8,333 mm, perlakuan C (37,5%) dengan rata-rata diameter daerah hambat sebesar 8,5 mm dan perlakuan D (50%) rata-rata diameter daerah hambatnya yaitu 8,667 mm.

Dari hasil analisa grafik, diketahui bahwa hubungan konsentrasi supernatan *Vibrio* sp. terhadap diameter daerah hambat bakteri *A. hydrophila* berbentuk regresi linier dengan persamaan $y = 0{,}049x + 6{,}608$ dan nilai koefisien korelasi sebesar $r = 0{,}989$.

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disarankan sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan tentang pengaruh perbedaan konsentrasi supernatan *Vibrio* sp. dalam aktivitas penghambatan bakteri *A. hydrophila* di atas konsentrasi 50% sehingga dapat diketahui konsentrasi optimal dari supernatan *Vibrio* sp. Selain itu perlu diadakan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh konsentrasi *Vibrio* sp yang berupa supernatan secara in-vivo terhadap organisme air yang terserang bakteri *A. hydrophila*.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena dengan rahmat dan hidayah-Nya penulisan skripsi ini dapat terselesaikan. Penyusunan skripsi merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Atas terselesaikannya penulisan skripsi ini, penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

- Bapak Ir. Mohammad Fadjar, MSc. selaku Dosen Pembimbing I.
- Ibu Dr. Ir. Sri Andayani, MS. selaku Dosen Pembimbing II.
- Bapak dan Ibu tercinta yang selalu mendukung saya dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
- Teman – teman, atas semangat bantuannya dan informasi yang diberikan serta semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.

Penulis berharap semoga laporan ini dapat bermanfaat dan memberikan informasi bagi pihak yang berminat dan memerlukannya.

Malang, November 2011

Penulis

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR ISI

	Hal
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Kegunaan Penelitian	6
1.5 Hipotesis	6
1.6 Tempat dan Waktu	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Biologi *Aeromonas Hydrophila*	7
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	7
2.1.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan	8
2.1.3 Habitat dan Penyebarannya	9
2.1.4 Infeksi dan Tanda-Tanda Penyerangan	10
2.2 Isolasi Bakteri *Vibrio* sp.	10
2.2.1 Preparasi sampel Bakteri	10
2.2.2 Identifikasi Strain Bakteri	11
2.2.3 Uji Daya Hambat	13
2.2.4 16S rDNA	14
2.3 *Vibrio* sp. Sebagai Kandidat Probiotik	16
2.4 Uji *Well Diffusion* (Difusi Sumuran)	19

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN
3.1 Materi Penelitian 21
3.1.1 Alat-Alat Penelitian 21
3.1.2 Bahan-Bahan Penelitian 21
3.2 Metode Penelitian 22
3.3 Rancangan Percobaan 22
3.4 Prosedur Penelitian 23
3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan 23
3.4.2 Pembuatan Media 24
A. TSA (*Trypticase Soya Agar*) Pada *Aeromonas hydrophila* 24
B. BHI (*Brain Heart Infusion*) Pada *Vibrio* sp. 25
3.4.3 Preparasi Pembuatan Media Sumuran 25
A. Medium Agar Padat 25
B. Medium Agar Cair 26
C. Pembuatan Medium Sumuran 26
3.4.4 Pembuatan Supernatan *Vibrio* sp. 26
3.4.5 Persiapan Bakteri Uji 27
A. Pembiakan Bakteri *Aeromonas hydrophila* 27
B. Pembiakan Bakteri *Vibrio* sp. 27
C. Pewarnaan Gram Bakteri *Vibrio* sp. 28
D. Kultur Media Sumuran Bakteri *Aeromonas hydrophila* 28
E. Uji Tantang Supernatan *Vibrio* sp. Terhadap *Aeromonas hydrophila* 29
3.5 Parameter Uji 29
3.5.1 Parameter Utama 29
3.5.2 Parameter Penunjang 29
3.6 Analisa Data 29

4. HASIL DAN PEMBAHASAN
4.1 Hasil Kultur *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio* sp. 31
4.2 Penentuan Konsentrasi Supernatan *Vibrio* sp. 33
4.3 Diameter Daerah Hambat Supernatan *Vibrio* sp. Terhadap Aktivitas Penghambatan *Aeromonashydrophila* Menggunakan *Well Diffusion* (Difusi Sumuran) 36
4.4 Lingkungan Hidup Bakteri 38

5. KESIMPULAN DAN SARAN
5.1 Kesimpulan 39
5.2 Saran 39

DAFTAR PUSTAKA 40

LAMPIRAN 44

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR TABEL

Tabel **Hal**

1. Kualitas Air Tambak Udang Tradisional ……. 11
2. Uji Kimia dan Morfologi Strain Bakteri dalam Air dan Sedimen Tambak Udang …….. 12
3. Hasil Sidik Ragam Pengaruh Supernatan *Vibrio* sp. pada Konsentrasi yang Berbeda Terhadap Aktivitas Penghambatan *A. hydrophila* …….. 35
4. Hasil Uji BNT Diameter Daerah Hambat Supernatan *Vibrio* sp. ……. 36

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Hal**

1. Uji Daya Hambat 13
2. Hasil Sequensing Asam Amino *Vibrio* sp. X110-8 14
3. Denah percobaan 23
4. Kultur Murni *A. hydrophila* 31
5. Pewarnaan Bakteri *Vibrio* sp. 32
6. Uji Difusi Sumuran (*Well Diffusion*) Bakteri *A. hydrophila* (tanda panah menunjukkan diameter daerah hambat) 34
7. Grafik Rata-Rata Diameter Diameter Daerah Hambat *Vibrio* sp. Terhadap Aktivitas Penghambatan *A. hydrophila* 34
8. Grafik Hubungan Konsentrasi Supernatan *Vibrio* sp. Terhadap Diameter Daerah Hambat *A. hydrophila* 36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran **Hal**

1. Laporan Hasil Uji Bakteri *A. hydrophila* …….. 44
2. Data Perhitungan Diameter Daerah Hambat Bakteri *Aeromonas hydrophila* …….. 45
3. Cara Perhitungan Konsentrasi *Vibrio* sp. 50
4. Hasil Sequensing 16S rDNA *Vibrio* sp. …….. 51

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sub sektor perikanan sebagai salah satu komponen pendukung pembangunan ekonomi yang perlu terus ditingkatkan produksinya. Produksi perikanan budidaya sendiri secara keseluruhan diproyeksikan meningkat dengan rata-rata 4,9% per tahun. Target tersebut didasarkan atas dasar potensi pengembangan daerah perikanan budidaya yang memungkinkan di wilayah Indonesia (Sugianto, 2005).

Pengembangan usaha budidaya dapat dilakukan dengan cara memanfaatkan Sumber Daya Alam secara optimal dan penggunaan teknologi yang ramah lingkungan. Namun, terdapat berbagai kendala yang mampu menghambat peningkatan produksi perikanan diantaranya adalah kegagalan produksi akibat serangan wabah penyakit ikan yang bersifat patogenik baik dari golongan parasit, jamur, bakteri dan virus. Permasalahan lainnya adalah degradasi mutu lingkungan budidaya yang semakin buruk, yang disebabkan oleh kegiatan budidaya itu sendiri. Timbulnya serangan wabah penyakit tersebut pada dasarnya akibat terjadinya gangguan keseimbangan antara ikan, lingkungan yang tidak menguntungkan ikan dan berkembangnya patogen penyebab penyakit.

Patogen merupakan mikroorganisme yang dapat menyebabkan penyakit pada inang, sehingga akan terjadi perubahan struktur atau fungsi inangnya (Nicklin *et al.,* 2003). Salah satu contoh bakteri yang biasanya menyerang ikan air tawar adalah bakteri *Aeromonas hydrophila*. Bakteri ini bersifat patogenik, umumnya menyebabkan infeksi pada seluruh tubuh disertai dengan pendarahan pada organ dalam tubuh ikan. Bakteri ini dapat menyebar secara cepat pada padat penebaran tinggi yang dapat menyebabkan kematian pada benih ikan sampai 90% (Kabata, 1985).

Metode yang banyak digunakan untuk menanggulangi penyakit pada perairan budidaya sampai saat ini adalah pengobatan dengan menggunakan zat kimia atau biasa disebut dengan antibiotik. Cara ini sangat berisiko karena dapat berdampak negatif terhadap perairan budidaya. Dampak negatif yang ditimbulkan diantaranya

adalah resistensi terhadap bakteri, memerlukan biaya yang cukup mahal, serta dapat mencemari lingkungan.

Antibiotik biasanya diberikan melalui makanan, perendaman, atau penyuntikan, sehingga residu antibiotik dapat terakumulasi pada ikan. Penggunaan antibiotik secara terus menerus dapat meningkatkan frekuensi mutasi sehingga melahirkan generasi bakteri baru yang resisten (Lewis, 2001). Untuk menghindari dampak negatif penggunaan antibiotik, penanggulangan penyakit ikan dapat dilakukan dengan menggunakan probiotik. Dalam budidaya akuakultur penggunaan probiotik tidak sepopuler pada budidaya ternak dan unggas namun beberapa studi mengungkapkan potensi probiotik sebagai suatu strategi yang efektif dalam memerangi penyakit dalam budidaya (Gatesoupe 1999, Gram *et al*., 1999 *dalam* Chythanya *et al*., 2002).

Pemanfaatan bakteri antagonis sebagai agen biokontrol akan semakin penting dari segi ekosistem akuakultur, mengurangi dan bahkan menghilangkan penggunaan antibiotik sehingga tercipta sistem budidaya yang ramah lingkungan (Isnansetyo, 2001). Mikroorganisme bersifat antagonis terhadap mikroorganisme lain karena menghasilkan antibiotik, bakteriosin, siderofor, lizosim, protease, H_2O_2 atau asam organik sehingga pH pada media tumbuh tersebut berubah (Sugita *et.al.,*1997). Selanjutnya Verschuere *et.al.,* (2000) menambahkan bahwa mekanisme bakteri antagonis yang dapat digunakan sebagai biokontrol adalah menghasilkan senyawa penghambat pertumbuhan patogen, terjadi kompetisi pemanfaatan senyawa tertentu atau kompetisi pemanfaatan energi, kompetisi tempat menempel, mempertinggi tanggap kebal inang, meningkatkan kualitas air dan adanya interaksi dengan fitoplankton serta zooplankton.

Penggunaan strain bakteri *Vibrio* sp. berupa supernatan dalam menghambat aktivitas bakteri *A. hydrophila* yang dijadikan kandidat probiotik didasari oleh penelitian Austin *et.al.* (1995). Dalam penelitian Austin *et,al.* (1995), ditarik kesimpulan bahwa supernatan dari probion itu mampu menghambat *Aeromonas* dan *Vibrio* dengan produksi metabolit yang berpotensi membahayakan. Pengertian probiotik menurut Gatesoupe (1999) yaitu sel mikrobia yang diberikan dengan berbagai cara sehingga

masuk ke dalam saluran pencernaan dengan maksud untuk mempertinggi kesehatan inang. Probiotik menurut definisi tersebut dapat dibedakan menjadi tiga yaitu: (1) mikroorganisme yang dimasukkan ke dalam saluran pencernaan dengan maksud untuk meningkatkan kesehatan ikan maupun udang, (2) mikroorganisme yang digunakan untuk mempertahankan atau meningkatkan kualitas lingkungan budidaya ikan (bioremidiasi) dan (3) mikroorganisme yang dapat menekan mikroorgaanisme patogen (biokontrol).

Selain itu, menurut Sugita *et.al.* (1997), *Vibrio* sp. menunjukkan efek antagonis yang kuat setelah diinkubasi pada medium agar padat, sementara aktivitas bakteri melemah setelah dideteksi dengan menggunakan medium cair. *Vibrio* sp. NM 10 yang diisolasi dari *Leiognathus nuchalis* bersifat antagonis terhadap *Pasteurella piscicida* karena menghasilkan protein dengan berat molekul kurang dari 5 kDa. Protein tersebut diduga bakteriosin atau senyawa serupa bakteriosin.

1.2 Rumusan Masalah

Bakteri A. *hydrophila* merupakan bakteri virulen pada budidaya air tawar yang dapat menimbulkan berbagai penyakit bagi organisme yang dibudidayakan. Menurut Handajani dan Samsundari (2005) *dalam* Habib (2010), penyakit merupakan suatu keadaan dimana organisme tidak dapat mempertahankan keadaan normal. Penyakit terjadi akibat adanya interaksi antara inang yang lemah, patogen yang kuat dan kualitas lingkungan yang menurun akibat berbagai bahan pencemar (Madeali *et. al.,* 2004).

Infeksi *A. hydrophila* dapat terjadi akibat perubahan kondisi lingkungan, stres, perubahan temperatur air yang terkontaminasi dan ketika *host* tersebut telah terinfeksi oleh virus, bakteri atau parasit lainnya (infeksi sekunder) (Naziri, 2010). *A. hydrophila* telah dihubungkan dengan beberapa penyakit pada ikan termasuk ekor busuk, sirip busuk dan *haemorrhagic septicaemia*. *Haemorrahagic septicaemia* ditandai oleh luka kecil pada permukaan tubuh ikan, sering mengarah pada pengelupasan sisik, pendarahan pada insang dan dubur, borok, bisul, *exopthalmia* (mata membengkak)

dan pembengkakan perut. Pada bagian dalam, dimungkinkan adanya cairan ascetic di dalam rongga peritoneal, kekurangan darah merah dan pembengkakan ginjal serta hati (Miyazaki dan Kaige, 1985).

Pengendalian penyakit *A. hydrophila* dengan memanfaatkan bakteri *Vibrio* sp. sebagai kandidat probiotik dalam lingkungan perairan merupakan salah satu alternatif yang dapat dilakukan. Bakteri *Vibrio* sp. yang dijadikan kandidat probiotik diubah menjadi supernatan cair melalui proses sentrifugasi sebanyak 10.000 rpm selama 15 menit. Kemudian supernatan disaring dengan menggunakan filter mikro 0,2 µ.

Probiotik adalah mikroorganisme yang memiliki kemampuan mendukung pertumbuhan dan produktifitas ikan dan udang. Penerapan probiotik pada ikan dan udang selain berfungsi untuk menyeimbangkan mikroorganisme dalam pencernaan agar tingkat serapannya tinggi, probiotik juga bermanfaat menguraikan senyawa-senyawa sisa metabolisme dalam air. Sehingga probiotik dapat berfungsi sebagai bioremidiasi, biokontrol, immunostimulan serta memacu pertumbuhan (Poernomo, 2004).

Aktivitas antagonis *Vibrio* terbukti dapat menghambat sejumlah patogen diantaranya, penggunaan strain probiotik dari *V. alginoliticus* membentuk perlawanan terhadap salmon yang diuji tantang dengan *A. salmonicida, V. anguillarum, V. ordalli*. Selain itu probion tidak menimbulkan efek yang berbahaya bagi tubuh salmon itu sendiri (Austin *et. al.,* 1995). Balca'zar (2003) menambahkan bahwa pemberian campuran bakteri strain *Bacillus* dan *Vibrio* sp. 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 aktivitas antibakteri.

Penggunaan *Vibrio* sp. yang dibentuk menjadi supernatan sebagai kandidat probiotik diduga menghasilkan beberapa komponen antimikroba ekstraseluler. Dalam

penelitian Chytanya *et.al.,* (2002) menyatakan bahwa munculnya kegiatan antagonistik dalam medium ketika sel mencapai fase stasioner pertumbuhan dan aktivitas maksimum pada tahap akhir stasioner menunjukkan bahwa faktor antimikroba adalah metabolit sekunder. Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa bukan sel bakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen melainkan produk ekstraseluler yang bertanggung jawab di dalamnya untuk menghambat pertumbuhan bakteri.

Berdasarkan uraian di atas dapat diperoleh suatu informasi bahwa *Vibrio* sp. dapat dijadikan sebagai alternatif pengendalian penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh perbedaan dosis *Vibrio* sp. sebagai kandidat probiotik untuk menghambat aktivitas *Aeromonas hydrophila* sehingga dapat dimanfaatkan secara tepat dalam penanggulangan penyakit.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan konsentrasi penggunaan *Vibrio* sp. sebagai kandidat probiotik yang berupa supernatan terhadap aktivitas penghambatan bakteri *A. hydrophila*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi dalam pencegahan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* dengan menggunakan *Vibrio* sp. sebagai kandidat probiotik dalam budidaya perairan.

1.5 Hipotesis

H0 : Diduga pemberian *Vibrio* sp. sebagai kandidat probiotik yang berbentuk supernatan dengan konsentrasi yang berbeda tidak mampu menghambat aktivitas bakteri A. *hydrophila*

H1 : Diduga pemberian bakteri *Vibrio* sp. sebagai kandidat probiotik yang berbentuk supernatan dengan konsentrasi berbeda mampu menghambat aktivitas bakteri A. *hydrophila*

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, pada bulan November 2010.

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi *Aeromonas hydrophila*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* menurut Buchanan dan Gibbons (1974) *dalam* Pelczar *et al.* (1986) adalah sebagai berikut:

Diviso : Protophyta

Class : Schizomycetes

Ordo : Pseudomonadales

Sub ordo: Pseudomonadinae

Famili : Vibrionaceae

Genus : Aeromonas

Spesies : *Aeromonas hydrophila*

Bakteri berasal dari kata bakterion (bahasa yunani) yang berarti tongkat yang kecil. Pada kenyataannya bakteri dibedakan menjadi 3 bentuk utama bulat, tongkat, maupun bentuk spiral (Heritage *et al.*, 1999). Bakteri merupakan suatu kelompok mikroorganisme prokariotik bersel tunggal yang sangat beragam dan terdapat dimana-mana. Bakteri dibedakan menjadi dua macam berdasarkan sifat dan komponennya yaitu bakteri gram-positif dan bakteri gram-negatif (Pelczar dan Chan, 1988). Bakteri gram-positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal, sedangkan bakteri gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tipis dengan sebuah membran luar ekstra (Elrod dan Stansfield, 2002).

Bakteri pada umumnya memperbanyak diri dengan pembelahan diri menjadi dua yang disebut dengan pembelahan binner. Pembelahan binner terjadi dengan cara sel-sel memanjang dan membentuk sebuah dinding melintang dari lapisan luar ke dalam dan kemudian memisahkan diri. Pada keadaan lingkungan tertentu, bakteri yang telah membelah diri akan berkelompok (Schmidt, 1994).

Bakteri *A. hydrophila* adalah bakteri yang berbentuk batang dengan ukuran 0,7-0,8 µm x 1,0-1,5 µm yang bergerak dengan menggunakan flagel monotrich pada ujung sel.

Bakteri ini termasuk dalam kelompok bakteri gram-negatif, yaitu organisme yang tidak mampu menahan zat pewarna setelah dicuci dengan alkohol 95% (Kabata, 1985).

2.1.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Pertumbuhan adalah pertambahan substansi hidup yang tidak reversibel biasanya disertai pertambahan ukuran dan pembelahan sel. Pada organisme bersel banyak, ukurannya bertambah sedangkan pada organisme bersel satu jumlah selnya yang bertambah (Scmidt, 1994). Pada umumnya bakteri dapat tumbuh pada pH netral (sekitar 7). Bakteri *Aeromonas* spp. akan tumbuh baik pada pH media antara 5,5-9,0 (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

Pertumbuhan bakteri dapat dibedakan menjadi beberapa fase menurut waktu pertumbuhannya diantaranya: fase adaptasi digunakan untuk menyesuaikan dengan kondisi lingkungan sekitar, lama fase adaptasi tergantung pada medium dan lingkungan pertumbuhan serta jumlah inokulan. Setelah mengalami fase adaptasi, bakteri mulai membelah dengan kecepatan yang rendah karena baru mulai menyesuaikan diri. Kemudian dilanjutkan dengan fase pertumbuhan logaritmik, dimana bakteri membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik. Pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh medium, seperti pH dan kandungan nutrien, juga kondisi lingkungan. Pada fase pertumbuhan lambat populasi bakteri diperlambat karena beberapa sebab, yaitu zat-zat nutrisi di dalam medium sudah berkurang dan adanya hasil-hasil metabolisme yang mungkin beracun atau dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Fase berikutnya adalah Fase pertumbuhan tetap (statis), pada fase ini jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati dan sel lebih tahan terhadap keadaan ekstrim seperti panas, dingin, radiasi dan bahan kimia. Fase terakhir adalah fase kematian, dimana populasi bakteri mulai mengalami kematian karena nutrien di dalam medium sudah habis dan energi cadangan di dalam sel habis. Kecepatan kematian tergantung dari kondisi nutrien, lingkungan, dan jenis bakteri (Zubaidah *et.al.,* 2006).

Pembiakan bakteri berlangsung secara aseksual, yaitu membiak dengan memanjangkan sel diikuti dengan pembelahan inti yang disebut dengan pembelahan binner. Rentan waktu yang dibutuhkan sel untuk membelah dari satu sel menjadi dua sel ±10 menit tergantung pada kondisi pertumbuhannya (Volk dan Wheeler, 1993). Bakteri bisa membelah jauh lebih cepat dari pada eukariota (sekali setiap 20 menit pada kondisi-kondisi ideal, berlawanan dengan 24-48 jam atau lebih lama lagi bagi kebanyakan sel eukariota) (Elrod dan Stansfield, 2002).

Menurut bidang pembelahan dan dari jumlah pembelahan sel bakteri dapat dibedakan bentuknya sebagai berikut bola berpasangan (diplokok), berbentuk rantai (streptokok), berbentuk lempeng atau paket (sarcina). Bakteri berbentuk batang dapat juga muncul berpasangan atau berbentuk rantai (Schmidt, 1994).

2.1.3 Habitat dan Penyebarannya

Genus *Aeromonas* mempunyai habitat di lingkungan perairan tawar. Keberadaan *Aeromonas* disuatu perairan erat hubungannya dengan jumlah kandungan bahan organik di perairan atau sedimen dasar. Bakteri ini diakui sebagai patogen dari hewan akuatik yang berdarah dingin. Penyakit yang disebabkan bakteri *A. hydrophila* ini lebih banyak menyerang ikan di daerah tropis dan daerah sub tropis dibandingkan dengan daerah dingin. Karena daerah tropis dan daerah sub tropis kandungan bahan organiknya lebih tinggi dibandingkan dengan daerah dingin. Di daerah tropis dan sub tropis penyakit *haemorhagic septicaemia* pada umumnya muncul pada musim kemarau (panas) (Prajitno, 2007).

2.1.4 Infeksi dan Tanda-Tanda Penyerangan

Infeksi bakteri timbul secara tidak langsung, tetapi banyak disebabkan oleh kondisi ikan yang lemah. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas* spp. bersifat oportunis yaitu mampu berkembang menjadi ganas pada keadaan optimum. Keadaan kandungan oksigen rendah, suhu tinggi, akumulasi bahan organik atau sisa-sisa metabolisme ikan pada kepadatan tinggi sangat menunjang menyebarnya bakteri ini (Sutjiati, 1990).

Bakteri *A. hydrophila* dapat menyerang semua jenis ikan air tawar dengan jenis penyakitnya disebut *Motil Aeromonas Septicaemia* (MAS) atau disebut juga *Haemorragic septicaemia*. Serangan bakteri ini bersifat laten (berkepanjangan), jadi tidak memperlihatkan gejala penyakit meskipun telah dijumpai pada tubuh ikan. Ikan yang terserang bakteri ini memiliki ciri-ciri sebagai berikut warna tubuh berubah menjadi agak gelap, kulitnya menjadi kesat dan timbul pendarahan yang selanjutnya akan menjadi borok (*haemorragic*), kemampuan berenangnya akan menurun dan sering berenang di permukaan air karena insangnya rusak sehingga sulit bernapas, sering terjadi pendarahan pada organ bagian dalam seperti hati, ginjal maupun limpa, seluruh siripnya rusak dan insangnya menjadi berwarna keputih-putihan, mata rusak dan agak menonjol (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

2.2 Isolasi Bakteri *Vibrio* sp.

2.2.1 Preparasi Sampel Bakteri

Sampel bakteri *Vibrio* sp. yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari air dan sedimen yang terdapat di tambak udang tradisional daerah Bangil, Pasuruan, jawa Timur. Sebelum dilakukan pengambilan sampel, maka perlu diadakan pengukuran kualitas air yang meliputi pH, temperatur, salinitas dan DO. Pengukuran kualitas air ini menggunakan alat bantu DO meter “Hanna”, refraktometer “Atago” dan pH meter “WTW pH 330”. Kualitas air yang telah diukur dapat dilihat pada Tabel 1. di bawah ini (Fadjar *et.al.,* 2009).

Tabel 1. Kualitas Air Tambak Udang Tradisional

No.	Parameter	
1.	pH	8,12 – 8,44
2.	Temperatur	30 – 31,5 ^{o}C
3.	Salinitas	25 – 31 ppt
4.	DO	4,4 – 5,6 ppm

Sumber: Fadjar *et.al.* (2009)

Hasil pengukuran parameter kualitas air menunjukkan konsentrasi pH berkisar antara 8,12 – 8,44. Menurut Ahmad (1991) dan Rheinheimer (1985) *dalam* Badjoeri dan Tri (2008) menyatakan bahwa bakteri di perairan dapat tumbuh optimal pada kisaran pH antara 6,5 – 8,5 dan fluktuasi pH di perairan merupakan proses alami karena aktivitas mikroorganisme (bakteri dan fungi). Suhu rata-rata di tambak uji yaitu 30 – 31,5 ^{0}C, kondisi suhu ini merupakan suhu optimal untuk pertumbuhan udang yaitu antara 28 – 30 ^{0}C (Boyd, 1990 *dalam* Badjoeri dan Tri (2008).

Sedangkan, hasil pengukuran salinitas perairan tambak udang tradisional yaitu 25-31 ppt. Menurut Rheinheimer (1985) *dalam* Badjoeri dan Tri (2008), salinitas tertinggi untuk pertumbuhan mikroorganisme *halophilic* (bakteri dan fungi), yaitu 25 – 40 ppt dan tumbuh optimal pada salinitas 5 – 20 ppt. Konsentrasi oksigen terlarut di tambak uji mencapai 4,4 – 5,6 ppm. Kondisi ini layak untuk mendukung kehidupan ikan atau udang yang dibudidayakan dan aktivitas mikroorganisme (bakteri) untuk melakukan proses biogeokimia di perairan (Tri dan Badjoeri, 2008).

2.2.2 Identifikasi Strain Bakteri

Bakteri yang berasal dari air dan sedimen tambak udang tradisional diisolasi menggunakan system pipa PVC (Huys, 2003 *dalam* Fadjar *et.al.,* 2009). Sedimen bakteri ini diuji di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Sedangkan, pengujian air tambak dilakukan di Laboratorium Balai pengembangan Budidaya Air Payau, Bangil, Pasuruan. Bakteri yang berasal dari air diuji secara kimia dan morfologi menggunakan BD BBL Crystal Kit. Dan, sampel yang berasal dari sedimen diuji menggunakan Microbact ^{TM} Identification Package (Fadjar *et.al.,* 2009). Strain bakteri yang didapat dari sampel air dan sedimen diuji secara kimia dan morfologi yang dapat dilihat pada Tabel 2. di bawah ini.

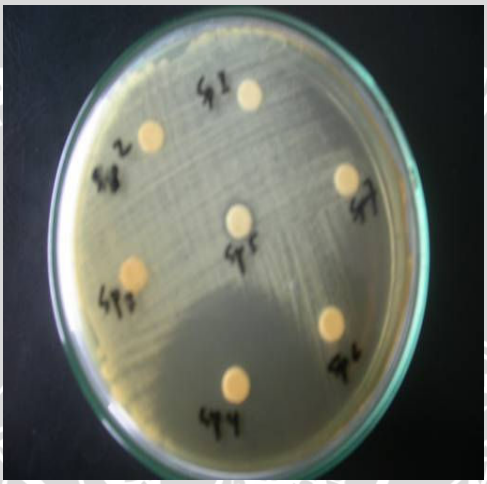
Tabel 2. Uji Kimia dan morfologi Strain Bakteri dalam Air dan Sedimen Tambak Udang Tradisional

No.	Test	Bacteria							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Oxidase	-	+	-	+	+	-		
2.	Motility	-	-	-	+	+	-		
3.	Nitrate	-	+	-	-	+	-		
4.	Lysine	+	+	-	+	+	-		
5.	Ornithine	-	-	-	+	-	-		
6,	H_2S	-	+	-	-	-	-		
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	-	-	-	-	-	-		

Catatan:. 1 = *Acinetobacter baumanii*, 2 = *Vibrio* sp, 3 = *Proteus rettgeri*, 4 = *V. parahaemoliticus*, 5 = *Pseudomonas aeruginosa*, 6 *licheniformis Bacillus*, 7 = *Vibrio alginoliticus*, 8 = *Shigella* sp. No 1-5 diuji dengan Microbact Identifikasi Kit, No. 6 diuji secara manual, dan No 7 dan 8 juga diuji dengan BD BBL Crystal Gram dan langsung masuk ke hasil spesies (Fadjar *et.al.,* 2009)

2.2.3 Uji Daya Hambat

Uji daya hambat dilakukan untuk mengetahui karakteristik masing-masing inhibitor bakteri *V. harveyi.* Hasil uji daya hambat bakteri ditunjukkan pada Gambar 1. berikut ini.



Gambar 1. Uji Daya hambat
(sp1 = *Acinetobacter*, sp2 = *Proteus vulgaris*, sp3 = *P. aeroginosa*, sp4 = *Vibrio* sp., SP5 *licheniformis Bacillus* =, SP6 = *Shigella* sp, sp7 = *V. alginolyticus*.) (Fadjar, *et.al.,* 2009)

Hasil uji penghambatan menunjukkan bahwa hambatan yang paling kuat dilakukan oleh bakteri *Vibrio* sp. Dengan diameter ± 30 mm (Fadjar *et.al.,* 2009). Daya hambat antibakteri dengan diameter lebih dari 20 mm dapat dikategorikan sebagai penghambatan yang kuat (Davis and Stout, 1971 *dalam* Fadjar *et.al.,* 2009).

2.2.4 16S rDNA

Menurut Fadjar *et.al.* (2009), identifikasi strain bakteri *Vibrio* sp. Dilakukan berdasarkan gen 16S rDNA yang meliputi tiga tahap sebagai berikut:

1) Isolasi DNA dari biakan sel bakteri.
2) Pemurnian plasid dengan menggunakan Spin miniprep Kit dan Microcentifuge.

3) Perbanyakan gen 16S rDNA menggunakan PCR dengan primer yang digunakan untuk perbanyakan 16Sr DNA yaitu:

F-Primer 16S-rRNA_340F21 (442 pb): 5 'CGG gag GGG GCA AAT GCA GTG 3'

R-Primer 16S-rRNA_760R22 (767 pb): 5 'CCT GTT TGC TCC CCA TTT CGC C 3'.

4) Pengurutan DNA

Menurut Santosa (2011) *dalam* Nurhayati *et.al.* (2006) menyatakan bahwa, kondisi penempelan primer ke urutan DNA (*annealing*) adalah 45 ^{0}C selama 10 menit. Sedangkan, hasil pengurutan DNA dibandingkan dengan data gen 16S rDNA dari *Gen Bank* menggunakan program BLAST (*Basic Local Aligment Search tool*) dari NCBI. Hal ini berguna untuk memperoleh urutan dengan tingkat homologiyang tinggi dengan urutan nukleotida isolate *Vibrio* sp. Hasil sequencing asam amino 16S rDNA dari Eurofine, MWG, Jerman, dapat ditunjukkan pada Gambar 2. berikut ini.

```
AJ345063 Vibrio probioticus partial 1  (1468 nt)
initn: 3803 init1: 3803 opt: 3803  Z-score: 3656.6  bits: 688.3 E(): 1.8e-195
banded Smith-Waterman score: 3803; 99.2% identity (99.5% similar) in 769 nt overlap (1-
769:328-1096)
                                                  10        20        30
x110-8                                   CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
                                         ::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO ACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
       300       310       320       330       340       350

               40        50        60        70        80        90
x110-8 TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGT
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGT
       360       370       380       390       400       410

              100       110       120       130       140       150
x110-8 ACTTTCAGCAGTGAGGAAGGTGGATGCGGTAATAGCGTATTCATTTGACGTTAGCCGCAG
       ::::::::::::::::::::::..:::::: :::::::::::::::::::::::::: ::::
EM_PRO ACTTTCAGCAGTGAGGAAGGTKSATGCGTTAATAGCGTATTCATTTGACGTTAGCTGCAG
       420       430       440       450       460       470

              160       170       180       190       200       210
x110-8 AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAA
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAA
       480       490       500       510       520       530

              220       230       240       250       260       270
x110-8 TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCG
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCG
       540       550       560       570       580       590

              280       290       300       310       320       330
x110-8 GGGCTCAACCTCGGAATAGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAG
       ::::::::::::::: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO GGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAG
       600       610       620       630       640       650
```

```
                340       350       360       370       380       390
x110-8 AATTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO AATTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG
       660       670       680       690       700       710

                400       410       420       430       440       450
x110-8 CCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO CCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
       720       730       740       750       760       770

                460       470       480       490       500       510
x110-8 CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCT
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCT
       780       790       800       810       820       830

                520       530       540       550       560       570
x110-8 TTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAA
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO TTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAA
       840       850       860       870       880       890

                580       590       600       610       620       630
x110-8 ATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGA
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO ATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGA
       900       910       920       930       940       950

                640       650       660       670       680       690
x110-8 AGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO AGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG
       960       970       980       990      1000      1010

                700       710       720       730       740       750
x110-8 AACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAG
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO AACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAG
      1020      1030      1040      1050      1060      1070

                760
x110-8 TCCCGCAACGATCGCAACC
       :::::::::: :::::::
EM_PRO TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGG
      1080      1090      1100      1110      1120      1130
```

Gambar 2. Hasil Sequensing Asam Amino *Vibrio* sp. x110-8 (Fadjar *et.al.,* 2009)

Strain bakteri *Vibrio* sp. yang didapatkan dari sampel air dan sedimen yang diuji secara kimia dan morfologi. Hasil morfologi bakteri *Vibrio* sp. menggunakan uji kimia 16S rDNA menunjukkan nilai 99,5% yang mirip dengan bakteri *V. probioticus* berdasarkan FASTA, hal yang berbeda terdapat pada susunan asam amino yaitu 79, untuk C yang terdapat dalam *Vibrio* sp. x110-8 dan T dalam *V. probioticus.* Berdasarkan sequencing 16S rDNA menunjukkan bahwa strain kandidat probiotik ini termasuk dalam genus *Vibrio* sp. Hasil sequencing 16S rDNA dapat dilihat pada Lampiran 4.

2.3 *Vibrio* sp. Sebagai Kandidat Probiotik

Bakteri *Vibrio* sp. yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari air dan sedimen yang terdapat dalam tambak udang tradisional di daerah Bangil, Pasuruan, Jawa Timur. Sumber air dari tambak tersebut berasal dari dua sungai yaitu Kedunglaran dan Masangan yang berpengaruh terhadap kelimpahan *Vibrio* sp. Dengan kata lain perairan yang berasal dari dua sungai tersebut tidak memenuhi standar kualitas air yang baik (Anam, 2007 *dalam* Fadjar *et. al.,*2009). Sedangkan pada kenyataannya daerah tersebut merupakan daerah terbesar peghasil udang di Pasuruan, Jawa Timur. Hal ini menunjukkan bahwa beberapa mikroorganisme dapat menghasilkan bahan antimikroba yang menghambat patogen *Vibrio,* maupun mengganggu kesehatan ikan dan udang (Fadjar, *et. al.,* 2009).

Vibrio 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).

Medium umum yang dapat digunakan untuk kultur *Vibrio* 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). Temperatur pertumbuhan *Vibrio* sp adalah 18 – 30℃, sedangkan Vibrio chloreae tidak dapat berkembang dengan baik pada temperatur dibawah 15℃ (Fardiaz, 1992).

Penggunaan strain probiotik dari *V. alginolyticus* memberikan perlawanan yang lebih besar dalam Salmo salar diuji tantang dengan *A. salmonicida, V. anguillarum* dan *V. ordalii* (Austin *et. al.*, 1995.). Riquelme *et. al.*, (1997) telah menunjukkan bahwa strain *Vibrio* sp. mampu memberikan perlindungan dalam larva kerang terhadap *V. anguillarum* dan patogen terkait, saat pra-perawatan. Bakteri yang menunjukkan aktivitas antagonis memiliki aplikasi potensial sebagai agen biokontrol.

Kata probiotik berasal dari bahasa Yunani yang artinya adalah “untuk hidup” dan pertama kali istilah probiotik digunakan oleh “L. Illey dan S. Tillwell” pada tahun 1965 untuk menjelaskan substitusi yang dihasilkan oleh suatu organisme yang merangsang

pertumbuhan organisme lain. Menurut Rawford (1979) *dalam* Faishal (2008), probiotik adalah kultur dari suatu mikroorganisme hidup yang dimasukkan pada ternak melalui pencampuran dalam ransum untuk menjamin ketersediaan populasi bagi mikroorganisme di dalam usus. Kultur tersebut mengandung bakteri spesifik, serta menghasilkan respon optimum dalam jarak dosis tertentu.

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).

Mekanisme kerja probiotik dijelaskan oleh Soeharsono (1998) *dalam* Abun (2008) yang menyatakan bahwa probiotik merupakan mikroba hidup yang patogen, yang mekanisme kerjanya mendesak mikroba non-indigenous keluar dari ekosistem saluran pencernaan, dan menggantikan lokasi mikroba patogen di dalam saluran pencernaan. Karena probiotik berasal dari mikroba *indigenous*, maka proses translokasi yang terjadi berjalan secara alamiah di dalam ekosistem usus. Mikroba patogen non-indegenous merupakan benda asing, oleh karena itu didesak keluar dari saluran pencernaan. Mekanisme probiotik ini dalam usus adalah dengan mempertahankan keseimbangan, mengeliminasi mikroba yang tidak diharapkan atau bakteri patogen dari induk semang. Jadi meknisme kerja probiotik sangat berbeda dengan mekanisme kerja antibiotik. Mekanisme kerja antibiotik dengan cara membunuh mikroba, baik patogen maupun bakteri apatogen.

Menurut Budi (2009), hasil yang diharapkan dari aplikasi probiotik yaitu:

- Berkurangnya akumulasi bahan organik di dasar tambak.
- Semakin berkurangnya potensi bakteri pathogen.

- Stabilitas kualitas air.
- Meningkatkan kesehatan udang, melalui kondisi lingkungan yang terbentuk
- Tercipta atau terkondisikan suatu mikroekosistem tambak (termasuk sedimen yang menguntungkan dalam menjamin proses budidaya berkelanjutan (produktif) dari siklus ke siklus.

Sedangkan, yang perlu diperhatikan dalam aplikasi probiotik adalah sifat bakteri itu sendiri, meliputi:

- Aerob (membutuhkan oksigen dalam aktivitasnya).
- Anaerob (tidak membutuhkan oksigen dalam aktivitasnya).
- Fakultatif (bisa membutuhkan oksigen dan bisa juga tidak).
- Ada juga bakteri fotosintetik yang dalam aktivitasnya membutuhkan sinar matahari (jenis rhodobacter).

Menurut Balca'zar *et.al.* (2007), probiotik dapat diberikan kepada host atau ditambahkan kepada lingkungan perairan dalam beberapa cara yaitu: melalui pakan hidup, perendaman, selain itu manajemen budidaya perairan dan pakan.

2.4 Uji *Well Diffusion* (Difusi Sumuran)

Menurut Jawetz *et.al.* (2005) *dalam* Soranta (2009), bahwa penentuan kepekaan bakteri patogen terhadap antimikroba dapat dilakukan dengan salah satu dari dua metode pokok yakni dilusi atau difusi. Penting sekali untuk menggunakan metode standar untuk mengendalikan semua faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba.

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas. Metode silinder yaitu meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi tahan karat di atas media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Tiap silinder ditempatkan sedemikian rupa hingga berdiri di atas media agar, diisi dengan larutan yang akan diuji dan diinkubasi. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling silinder. Metode lubang 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. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling lubang. Metode cakram kertas yaitu meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling cakram (Kusmiyati dan Agustini, 2006).

Metode difusi dikenal dua pengertian yaitu zona radikal dan zona irradikal. Zona radikal yaitu suatu daerah di sekitar disk atau sumuran di mana sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan kuman. Zona irradikal adalah suatu daerah di sekitar disk atau sumuran dimana pertumbuhan bakteri dihambat oleh antimikroba, tetapi tidak mematikan, disini terlihat pertumbuhan kuman yang kurang subur dibanding dengan daerah di luar pengaruh obat tersebut (Jawezt, *et al,* 1986 *dalam* Aisah, 2010).

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat-Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada saat penelitian ini adalah:

- Petridisk
- Tabung reaksi
- Erlenmeyer
- Gelas ukur
- Pipet mikro
- Pipet ukur
- Karet penghisap
- Rak tabung reaksi
- Jarum ose
- Pembakar bunsen
- Eppendorf
- Lemari pendingin
- Kompor
- Inkubator
- Autoclave
- Sentrifuge
- Timbangan sartorius
- Spektrofotometer
- Cetakan sumuran
- Waterbath
- Kamera digital
- Kaca objek
- Mikroskop

3.1.2 Bahan-Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada saat penelitian ini adalah:

- Biakan murni *A. hydrophila*
- Alkohol Spiritus
- Kapas
- Filter mikro 0,2 µ
- Alumunium foil
- Tisu
- Kertas label
- Kristal violet
- TSA (*Triptic Soya Agar*)
- TSB (*Triptic Soya Broth*)
- BHI (*Brain Heart Infusion*)
- Bacto Agar
- Aquadest
- Alkohol 70%

- Lugol
- *Pancreatic digest of casein*
- *Papaic digest of soybean*
- NaCl
- *Dibasic potasium fosfat*

3.2 Metode Penelitian

Metode Penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil. Hasil yang akan didapatkan 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 penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). 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) terdapat beberapa keuntungan dari penggunaan RAL yaitu:

a. Denah perancangan lebih mudah.
b. Analisa statistika terhadap subyek percobaan sangat sederhana.
c. Fleksibel dalam penggunaan jumlah perlakuan dan jumlah ulangan.
d. Kemungkinan kehilangan informasi data lebih kecil.

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

$$Yij = \mu + \alpha i + \sum ij$$

Keterangan:

Yij = hasil pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = nilai rata-rata

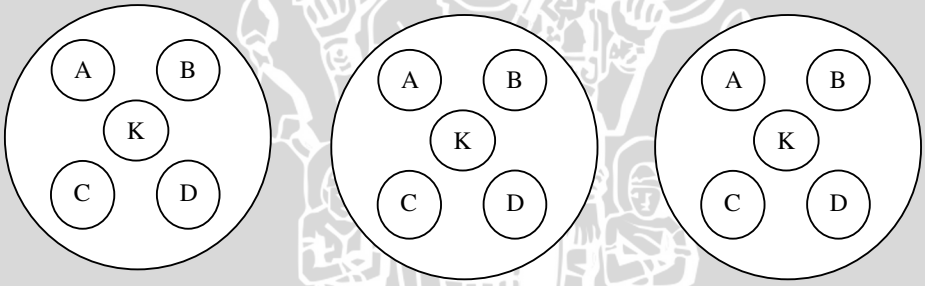
αi = pengaruh perlakuan ke-i

∑ij = pengaruh galat (sisa) dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Penelitian ini terdiri dari 4 perlakuan, 3 kali ulangan dan 1 kontrol. Sebagai perlakuan adalah pemberian supernatan *Vibrio* sp. dengan konsentrasi yang berbeda untuk mengetahui diameter daerah hambat bakteri patogen. Adapun perlakuan tersebut adalah sebagai berikut:

- A = konsentrasi 12,5 %
- B = konsentrasi 25 %
- C = konsentrasi 37,5 %
- D = konsentrasi 50 %
- K = kontrol (tanpa perlakuan)

Jumlah sampel yang diamati adalah sebanyak 12 sampel. Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah percobaan seperti pada Gambar 3. berikut ini.



Ulangan 1 Ulangan 2 Ulangan 3

Gambar 3. Denah Percobaan

Keterangan:

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

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Rangkaian proses sterilisasi alat dan bahan sebagai berikut:

a. Alat yang akan disterilkan dicuci dan dibungkus dengan menggunakan kertas koran dan diikat dengan menggunakan benang. Sedangkan bahan yang akan

disterilkan dibungkus dengan menggunakan alumunium foil kemudian diikat dengan menggunakan benang.

b. Alat dan bahan yang telah dibungkus dimasukkan ke dalam autoclave yang sebelumnya telah diisi dengan air kemudian tutup rapat.

c. Autoclave ditaruh di atas kompor yang sudah dinyalakan, setelah beberapa saat manometer akan menunjukkan angka 1 atm dan suhu 121^0C. Keadaan ini dipertahankan selama 15 menit dengan mengatur kran pembuka dan penutupnya.

d. Kompor dimatikan dan ditunggu beberapa saat sampai manometer dan termometer menunjukkan angka nol.

e. Kemudian buka pengatur klep pengaman dengan arah horisontal untuk mengeluarkan sisa uap yang tertinggal di dalam.

f. Alat dan bahan diangkat dari autoclave.

g. Alat yang telah disterilkan disimpan dalam inkubator sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

3.4.2 Pembuatan Media

A. TSA (*Trypticase Soya Agar*) pada *A. hydrophila*

Pembuatan media TSA (*Trypticase Soya Agar*) dapat dijelaskan sebagai berikut:

a. *Trypticase Soya Agar* sejumlah 40 gram dilarutkan dalam aquadest sejumlah 1 liter

b. Larutan TSA dididihkan dalam waterbath pada suhu 100^0C hingga media tersebut larut dan homogen selama 15 menit.

c. TSA yang sudah steril dituang ke dalam cawan petri, lalu dibiarkan memadat.

d. Media TSA yang sudah memadat dibungkus dengan koran dan disimpan dalam inkubator selama 24 jam.

e. Kemudian, media dikeluarkan dari inkubator. Sedangkan media yang belum dipakai disimpan dalam lemari es.

B. BHI (*Brain Heart Infusion*) pada *Vibrio* sp.

Media BHI adalah media dalam bentuk bubuk/ powder yang terdiri dari calf brain infusion solids 12,5 gram, beef heart infusion solids 5,0 gram, protease pepton 10 gram, dextrose 2 gram, sodium klorida 5 gram dan disodium phosphate 2,5 gram. Metode pembuatan media BHI (*Brain Heart Infusion*) dapat dilihat seperti di bawah ini:

a. Bubuk/ powder media BHI ditimbang sebanyak 37 gram untuk dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
b. Bubuk BHI ditambahkan aquadest sebanyak 1000 ml sambil digoyang sedikit demi sedikit untuk dihomogenkan.
c. Setelah itu larutan dipanaskan di waterbath pada suhu 100^0C selama 15 menit sampai terlarut sempurna.
d. Media yang terdapat dalam erlenmeyer tersebut disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121^0C selama 15 menit.
e. Media yang siap dipakai diinkubasi pada suhu 37^0C.

3.4.3 Preparasi Pembuatan Media Sumuran

A. Medium Agar Padat

Metode pembuatan medium agar padat dapat dilihat seperti di bawah ini:

a. 4 gram TSA dimasukkan kedalam erlemeyer 250 ml dan ditambahkan 100 ml aquadest.
b. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan dipanaskan di waterbath 100^0C selama 15 menit dengan sesekali digoyang sampai larut sempurna.
c. Larutan TSA kemudian disterilisasi pada autoclave 121^oC selama 15 menit.
d. Larutan TSA yang sudah disterilkan kemudian didinginkan sampai suhu ± 50^0C (hangat-hangat kuku).

e. Media TSA dituangkan dicawan petri steril ± 20 ml dan dibiarkan hingga dingin dan mengeras.

f. Selanjutnya media TSA dimasukkan kedalam inkubator suhu 37^0C selama 24 jam untuk uji sterilitas.

B. Medium Agar Cair

Metode pembuatan medium agar cair dapat dilihat seperti di bawah ini:

a. 3 gram TSB dimasukkan kedalam erlemeyer 250 ml untuk ditambahkan bacto agar 0,8 gram dan aquadest 100 ml, kemudian dihomogenkan.

b. Larutan TSB dipanaskan di water bath 100^0C selama 15 menit dengan sesekali digoyang sampai larut sempurna.

c. Selanjutnya larutan TSB dipipet kedalam tabung masing-masing 10 ml, ditutup dengan kapas, dan disterilisasi pada Autoclave 121^oC selama 15 menit.

d. Media TSB didinginkan ±50^0C, sehingga medium soft agar siap untuk digunakan.

C. Pembuatan Medium Sumuran

Rangkaian proses pembuatan medium sumuran sebagai berikut:

a. Alat sumuran ditancapkan pada medium agar padat dan ditambahkan suspensi bakteri OD : 0,1 sebanyak 0,1 ml.

b. Kemudian medium agar cair (hangat-hangat kuku) dituangkan, digoyang searah jarum jam.

c. Dibiarkan hingga dingin dan memadat.

d. Jika medium sudah benar-benar memadat alat sumuran segera diambil.

e. Medium siap untuk dipakai, dengan cara memasukkan kandidat antimikroba kedalam sumuran masing-masing 50 µl.

f. Selanjutnya media diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

3.4.4 Pembuatan Supernatan *Vibrio* sp.

Metode pembuatan supernatan *Vibrio* sp. dapat diuraikan sebagai berikut:

a. *Pancreatic digest of casein* ditimbang sebanyak 17 gram.
b. *Papaic digest of soybean meal* ditimbang sebesar 3 gram dan dicampur natrium klorida (NaCl) 5 gram, yang terakhir ditambah *dibasic potassium fosfat* 2,5 gram.
c. Kemudian, dicampur dan dilarutkan dalam 1 liter aquadest.
d. Larutan diinkubasi pada pH 7.3 selanjutnya disterilisasi dengan suhu 121 ^{0}C selama 15 menit.
e. Isolat *Vibrio* sp. disiapkan untuk dikultur di medium tersebut pada suhu 30 ^{0}C selama 2 kali 24 jam.
f. Hasil kultur dilakukan melalui proses sentriugasi sebanyak 10.000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan hasil supernatan.
g. Supernatan disaring dengan menggunakan filter mikro 0,2 µ, agar didapatkan supernatan cair.
h. Kemudian supernatan diencerkan untuk menghasilkan konsentrasi yang diinginkan (12,5%, 25%, 37,5%, 50%). Penentuan konsentrasi disajikan pada Lampiran 3.

3.4.5 Persiapan Bakteri Uji

A. Pembiakan Bakteri *A. hydrophila*

Pembuatan biakan bakteri *A. Hydrophila* dapat dilihat seperti di bawah ini:

a. Media TSA (*Trypticase Soya Agar*) disiapkan.
b. Pada media tersebut digoreskan isolat bakteri yang diambil dari biakan murni dengan menggunakan jarum ose yang sebelumnya dipanaskan di atas api bunsen.

c. Setelah itu cawan petri ditutup rapat dan pada bagian tepi dipanaskan di atas api bunsen.

d. Media yang telah berisi bakteri diinkubasi pada suhu 30^0C selama 24 jam atau sampai koloni tumbuh.

B. Pembiakan Bakteri *Vibrio* sp.

Proses pembiakan bakteri *Vibrio* sp. dapat dilihat sebagai berikut:

a. Hasil dari bakteri yang dibiakkan pada media TSA.

b. Hasil kerokan dimasukkan ke dalam media BHI dan dikocok sampai rata.

c. Media BHI diinkubasi dengan posisi miring pada suhu 37^0C selama 48 jam.

C. Pewarnaan Gram Bakteri *Vibrio* sp.

Metode pewarnaan gram bakteri *Vibrio* sp. dapat dilihat seperti berikut ini:

a. Kaca objek disemprot dengan menggunakan alkohol. Kemudian dibersihkan dengan menggunakan tisu dan dibakar pada api bunsen.

b. Jarum ose dibakar sampai berpijar dan didiamkan sebentar sampai dingin.

c. Biakan bakteri yang berasal dari cawan petri diambil dengan menggunakan jarum ose dan diletakkan pada kaca objek.

d. Selanjutnya dilakukan fiksasi sampel bakteri pada api bunsen dengan jarak 20 cm dari api.

e. Pewarna kristal violet ditambahkan sebanyak satu tetes dan didiamkan selama 2 menit.

f. Kemudian dicuci dengan air mengalir.

g. Lugol diteteskan kembali pada gelas objek dan didiamkan selama 1 menit.

h. Kaca objek dibilas dengan alkohol selama 30 detik, kemudian baru dibilas dengan air mengalir.

i. Ditambahkan pewarna safranin selama 15 detik dan dibilas kembali dengan air mengalir.

j. Didiamkan dan dikeringkan untuk selanjutnya diamati pada mikroskop.

D. Kultur Media Sumuran Bakteri Aeromonas hydrophila

Kultur media sumuran bakteri *A. Hydrophila* dapat dijelaskan sebagai berikut:

a. Bakteri uji dari stok bakteri diisolasi di medium selektif untuk mendapatkan bakteri murni kemudian diinkubasi pada suhu 37^0C selama 18-24 jam
b. Koloni diambil terpisah 1-2 koloni, masukkan kedalam medium cair TSB dan diinkubasi kembali pada suhu 37^0C selama 18-24 jam
c. Kultur bakteri yang telah tumbuh dispektrofotometer dengan panjang gelombang 625, untuk mendapatkan OD :0,1
d. Suspensi bakteri dengan OD : 0,1 tersebut siap untuk dipakai sebagai uji anti mikroba.

E. Uji Tantang Supernatan *Vibrio* sp. Terhadap *Aeromonas hydrophila*

Uji tantang supernatan *Vibrio* sp. sebagai kandidat probiotik terhadap aktivitas hambat *A. Hydrophila* dapat dilihat sebagai berikut:

a. Supernatan *Vibrio* sp. yang telah diencerkan (0%, 12,5%, 25%, 37,5% dan 50%) disiapkan
b. Kemudian supernatan diambil dengan pipet mikro sebanyak 0,25 µl dan dimasukkan dalam lubang sumuran dengan diameter 6 mm.
c. Hasil uji difusi sumuran diinkubasi pada suhu 37^0C selama 24 jam.
d. Kemudian diamati hasil dari uji tantang tersebut.

3.5 Parameter Uji

3.5.1 Parameter Utama

Parameter utama yaitu menggunakan parameter kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari pengukuran daerah hambatan *Vibrio* sp. terhadap aktivitas bakteri *A. hydrophila* pada masing-masing perlakuan yang terlihat di sekitar lubang sumuran dengan menggunakan penggaris milimeter.

3.5.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang pada penelitian ini adalah suhu inkubator dan pH media, dimana kedua faktor tersebut dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri.

3.6 Analisa Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur (variabel tidak bebas) digunakan analisa keragaman atau uji F. Apabila nilai F berbeda nyata dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perlakuan yang memberikan respon terbaik pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%).

Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan hasil yang dipengaruhi digunakan analisa regresi yang bertujuan untuk menentukan sifat dari fungsi regresi yang memberikan keterangan mengenai pengaruh perlakuan yang terbaik pada respon.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Kultur *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio* sp.

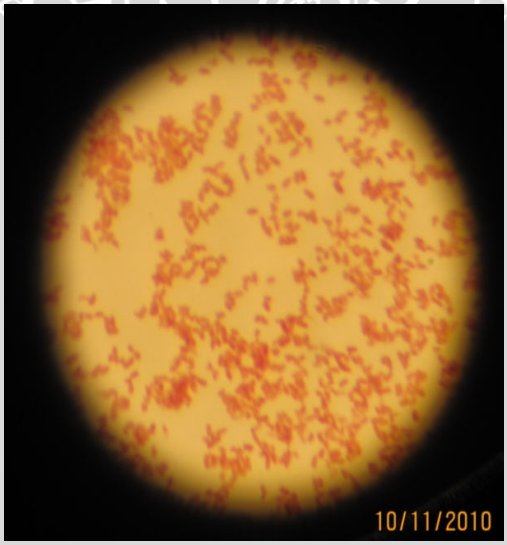
Bakteri *A. hydrophila* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan biakan murni yang diperoleh dari Balai Karantina Ikan Djuanda, Surabaya (Lampiran 1). Biakan ini kemudian diremajakan dan di perbanyak dengan metode *streak* (gores) pada media padat TSA (*Tripticase Soya Agar*). Menurut Irianto (2005) metode goresan hanya dilakukan dengan menyentuhkan ujung jarum ose. Volk dan Wheeler (1993), menambahkan bahwa waktu generasi beraneka menurut jenis organisme, kadar nutrien, dalam medium dan suhu inkubasi. Kondisi lain seperti pH, persediaan oksigen bakteri yang bersifat aerob.Hasil pengamatan bakteri *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 4. dibawah ini.

Gambar 4. Kultur Murni *A. hydrophila*

Hasil pengamatan bakteri *A. hydrophila* pada saat penelitian yang ditanam pada media agar TSA (*Tripticase Soya Agar*) membentuk koloni yang berwarna kuning pucat dan bentuk koloni pada *A. hydrophila* membulat dengan permukaan cabang. Prajitno (2007), menjelaskan bahwa bakteri *Aeromonas* merupakan bakteri fakultatif anaerob, yaitu bakteri yang dapat berkembang dalam keadaan dengan atau tanpa oksigen, meskipun perkembangannya lebih cepat pada lingkungan yang terdapat oksigen. Bakteri fakultatif anaerob tersebar diseluruh medium jika diinokulasi pada

medium cair, bersifat heterotrofik yaitu mampu mengoksidasi bermacam-macam persenyawaan organik sebagai sumber karbon.

Bakteri *Vibrio* sp. didapatkan dari sedimen dan air tambak udang tradisional yang terletak di Bangil, Pasuruan, Jawa Timur. Bakteri *Vibrio* sp. ini dikultur dalam media BHI (*Brain Heart Infusion*). Morfologi bakteri *Vibrio* sp. diamati dengan teknik pewarnaan gram positif atau negatif. Hasil isolasi terhadap *Vibrio* sp. dalam media BHI menunjukkan bahwa morfologi bakteri yaitu bakteri gram negatif yang berbentuk batang. Proses pewarnaan gram pada sel bakteri gram positif memiliki afinitas yang tinggi terhadap Kristal violet sehingga mampu mempertahankan cat tersebut dan 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 (Taslihan, 1986 *dalam* Winarti, 2004). Bakteri diamati dengan menggunakan mikroskop Olympus perbesaran 1000x setelah dilakukan pewarnaan gram yang ditunjukkan pada Gambar 5. berikut ini.



Gambar 5. Gambar Pewarnaan Bakteri *Vibrio* sp.

Setelah didapatkan isolat bakteri uji maka dilakukan perbanyakan bakteri *A. hydrophila* pada media cair menggunakan TSB (*Tryticase Soya Broth*). Media TSB untuk bakteri uji yang digunakan sebanyak 100 ml dengan jumlah bakteri 1-2 koloni. Kemudian diinkubasi pada suhu 37^0C selama 18-24 jam. Kultur bakteri yang telah tumbuh dimasukkan dalam alat spektofotometer dengan panjang gelombang 625 nm

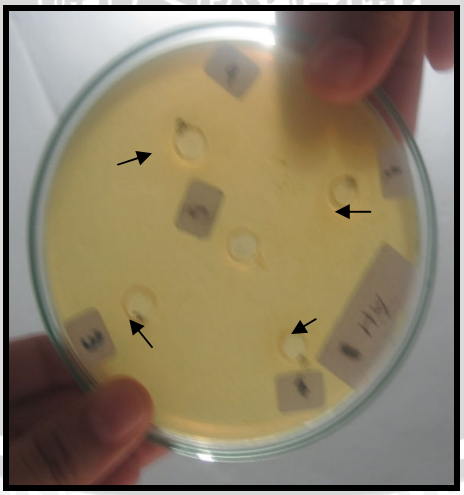
untuk mendapatkan OD (Optical Density): 0,1. Sehingga suspensi bakteri dengan OD: 0,1 tersebut siap untuk digunakan sebagai bakteri uji antimikroba.

4.2 Penentuan Konsentrasi Supernatan *Vibrio* sp.

Penentuan konsentrasi supernatan *Vibrio* sp. yang digunakan untuk uji tantang didapatkan dari penelitian pendahuluan. Pada penelitian pendahuluan digunakan beberapa konsentrasi yang diuji, yaitu 0% (kontrol), 12,5%, 25%, 50% dan 100%. Konsentrasi 12,5% memberikan diameter daerah hambat yang sangat kecil, sedangkan konsentrasi 25% sudah memberikan diameter daerah hambat yang optimal. Oleh karena itu, pada penelitian ini, konsentrasi yang digunakan yaitu 0% (kontrol), 12,5%, 25%, 37,5% dan 50%. Menurut Agustiyani *et.al.,* (2004), Starter bakteri yang digunakan untuk pengujian selanjutnya ialah yang telah mencapai pertumbuhan eksponensial dengan kepadatan sel $10^7 – 10^8$ sel/ml.

4.3 Diameter Daerah Hambat Supernatan *Vibrio* sp. Terhadap Aktivitas Penghambatan *A. hydrophila* Menggunakan *Well Diffusion* (Difusi Sumuran)

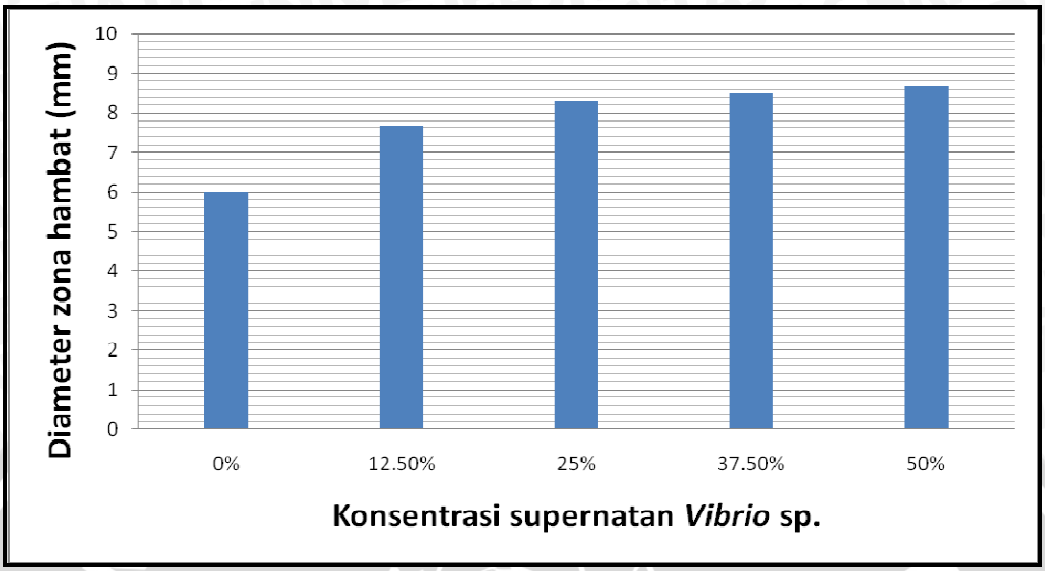
Uji aktivitas penghambatan supernatan *Vibrio* sp. dengan *well diffusion* (metode sumuran) dapat dilihat pada Gambar 4. sebagai berikut.



Gambar 6. Uji Difusi Sumuran (*well diffusion*) bakteri *A. hydrophila* (tanda panah menunjukkan diameter daerah hambat)

Gambar 6. dapat diketahui bahwa supernatan *Vibrio* sp. Mampu menghambat aktivitas bakteri *A. hydrophila.* Hal ini ditandai dengan terbentuknya diameter daerah hambat di

sekitar lubang sumuran media bakteri, dimana diameter daerah hambat pada bagian tepi berwarna kuning pucat sedangkan pada daerah pusat berwarna keputihan.



Gambar 7. Grafik Rata-rata Diameter Daerah Hambat *Vibrio* sp. Terhadap Aktivitas Penghambatan *A. hydrophila*

Dari hasil uji tantang Gambar 7. dapat diambil kesimpulan bahwa supernatan *Vibrio* sp. pada dosis yang berbeda memberikan daya hambat yang lebih besar jika dibandingkan dengan kontrol (0%). Sebaliknya semakin tinggi konsentrasi supernatan *Vibrio* sp. yang diberikan maka diameter daerah 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.

Pengaruh supernatan *Vibrio* sp. pada konsentrasi yang berbeda terhadap aktivitas bakteri *A. hydrophila* dapat diketahui dengan melakukan analisa sidik ragam (Lampiran 2). Hasil sidik ragam dapat dilihat pada Tabel. 3 di bawah ini.

Tabel 3. Hasil Sidik Ragam Pengaruh Supernatan *Vibrio* sp. pada Konsentrasi yang Berbeda Terhadap Aktivitas Penghambatan *A. hydrophila*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	14,333	3,583	14,332 **	3,48	5,99
Acak	10	2,5	0,25			
Total	14					

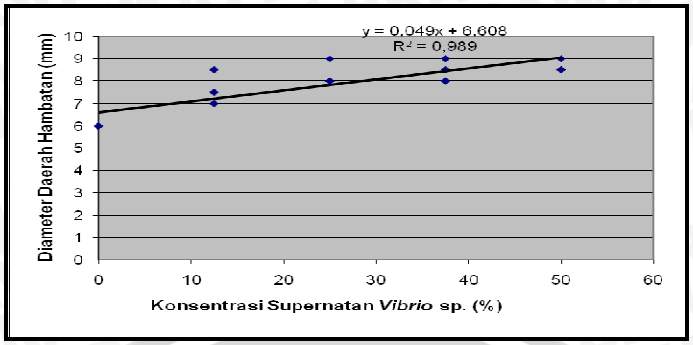
Berdasarkan hasil sidik ragam Tabel 3. dapat diketahui bahwa pemberian supernatan *Vibrio* sp. dengan konsentrasi yang berbeda memberikan hasil berbeda sangat nyata dalam menghambat aktifitas bakteri *Vibrio* sp. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan tiap perlakuan, dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf nyata 0,05% (selang kepercayaan 95%) maupun taraf nyata 0,01% (selang kepercayaan 99%). Hasil uji BNT dengan nilai BNT 5% dan 1% dapat dilihat pada Tabel 4. dan perhitungannya secara lengkap disajikan pada lampiran.

Tabel 4. Hasil Uji BNT Diameter Daerah Hambat Supernatan *Vibrio* sp.

Rataan Perlakuan	K= 6	A=7,667	B= 8,333	C= 8,5	D= 8,667	Notasi
K= 6	-					A
A= 7,667	1,667 ^{ns}	-				AB
B= 8,333	2,333 **	0,666 ^{ns}	-			BC
C= 8,5	2,5 **	0,833 ^{ns}	0,167 ^{ns}	-		BC
D= 8,667	2,667 **	1 **	0,334 ^{ns}	0,167 ^{ns}	-	C

Hasil uji BNT menunjukkan bahwa setiap perlakuan memiliki hasil yang berbeda. Dimana semakin tinggi konsentrasi supernatan *Vibrio* sp. yang diberikan maka semakin besar diameter hambatan yang dihasilkan. Urutan perlakuan terbaik adalah D → B/C → A, karena semakin besar konsentrasi yang digunakan maka semakin besar pula daya hambat yang dihasilkan. Pelczar *et al.,* (1988), menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka semakin cepat sel bakteri akan terbunuh.

Hubungan antara konsentrasi supernatan *Vibrio* sp. dengan diameter daerah hambat yang terbentuk dapat diketahui dengan menggunakan analisa regresi. Secara lengkap analisa regresi disajikan pada Lampiran 2. Grafik hubungan antara konsentrasi supernatan *Vibrio* sp. dengan diameter daerah hambat bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Gambar 8. Sebagai berikut.



Gambar 8. Grafik Hubungan Konsentrasi Supernatan *Vibrio* sp. terhadap Diameter Daerah hambat *A. hydrophila*

Hasil difusi sumuran menunjukkan bahwa diduga bukan sel bakteri yang mampu menghambat aktivitas bakteri patogen, melainkan produk ekstraseluler yang bertanggung jawab di dalamnya. Enzim dapat dibagi menjadi dua macam berdasarkan lokasi dimana enzim bekerja yaitu: (1) intraseluler enzim dimana enzim ini diproduksi dan berfungsi di dalam sel, (2) ekstraseluler enzim dimana diproduksi di dalam sel tetapi berfungsi di luar sel atau dalam habitat atau lingkungan (Budi, 2009).

Bakteri patogen menghasilkan berbagai enzim yang pada dasarnya tidak toksik tetapi berperan penting dalam proses infeksi, contohnya *Vibrio* sp. beberapa bakteri patogen memproduksi enzim hidrolitik seperti protease dan hialurodisase (Baehaki *et.al,* 2009). Protease adalah enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Enzim ini seringkali dibedakan menjadi proteinase dan peptidase. Protease mengkatalis hidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen besar, sedangkan peptidase mengkatalis hidrolisis fragmen polipeptida menjadi asam amino. Protease memegang peranan utama dalam banyak fungsi hayati, mulai dari tingkat sel, organ, sampai organisme, yaitu dalam melangsungkan reaksi metabolisme dan fungsi regulasi (Mell *et. al.,* 2000).

Dalam penelitian Chytanya *et.al.,* (2001), menyatakan bahwa munculnya kegiatan antagonistik dalam medium ketika sel mencapai fase stasioner pertumbuhan dan aktivitas maksimum pada tahap akhir stasioner menunjukkan bahwa faktor antivibrio adalah metabolit sekunder. Sehingga dapat disimpulkan bahwa supernatan dari probion tersebut mampu menghambat *A. hydrophila* dengan produksi metabolit yang

membahayakan berupa produk ekstraseluler. Menurut Lawrence (1995), metabolit sekunder merupakan senyawa yang dihasilkan tanaman dan mikroba, dalam hal ini adalah mikroba, seperti antibiotik dan lain sebagainya yang tidak essensial bagi pertumbuhan organisme. Metabolit sekunder biasanya terbentuk setelah metabolisme primer atau fase pertumbuhan selesai.

Jawetz *et. al.* (2001) menambahkan bahwa, mekanisme kerja antimikroba dibagi menjadi beberapa cara yaitu: (1) hambatan sintesis dinding sel, (2) perubahan permeabilitas membran sel atau penghambatan pengangkutan aktif melalui membran sel, (3) hambatan sintesis protein, (4) hambatan terhadap metabolism mikroba, serta (5) hambatan sintesis asam nukleat sel.

4.4 Lingkungan Hidup Bakteri

Media harus mempunyai pH yang tepat yaitu tidak terlalu asam dan tidak terlalu basa, 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 (Volk dan Wheeler, 1993). pH media yang digunakan dalam media penumbuhan bakteri sebesar 7.

Sedangkan suhu yang diterapkan pada masa inkubasi dalam penelitian ini yaitu sebesar 37^0C. 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, 1998).

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian "Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Supernatan *Vibrio* sp. Terhadap Aktivitas Penghambatan *Aeromonas hydrophila* secara in vitro" dapat disimpulkan sebagai berikut:

- Konsentrasi supernatan *Vibrio* sp. berpengaruh terhadap aktivitas penghambatan bakteri *Aeromonas hydrophila* secara in vitro.
- Hasil difusi sumuran menunjukkan bahwa bukan sel bakteri yang mampu menghambat aktivitas bakteri patogen, melainkan produk ekstraseluler yang bertanggung jawab di dalamnya.
- Rata-rata diameter daerah hambat pada bakteri *Aeromonas hydrophila* untuk perlakuan K (0%) adalah 6 mm, perlakuan A (12,5%) adalah 7,667 mm, perlakuan B (25%) adalah 8,333 mm. perlakuan C (37,5%) adalah 8,5 mm dan perlakuan D (50%) adalah 8,667 mm.
- Hubungan antara konsentrasi supernatan *Vibrio* sp. terhadap diameter daerah hambat menunjukkan bahwa hubungan berbentuk regresi linier dengan persamaan y = 6,608 + 0,049x dengan R = 0,989.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disarankan sebagai berikut :

- Sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan tentang uji efektivitas *Vibrio* sp. dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* di atas konsentrasi 50% sehingga dapat diketahui konsentrasi terbaik dari supernatan *Vibrio* sp.
- Perlu diadakan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh supernatan *Vibrio* sp. secara in vivo terhadap organisme air yang terserang bakteri *A. hydrophila.*

DAFTAR PUSTAKA

Abun. 2008. **Hubungan Mikoflora dengan Metabolisme Dalam Saluran Pencernaan Unggas dan Monogastrik.** Makalah Ilmiah. Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak. Fakultas Peternakan. Universitas Padjadjaran. Jatinangor.

Agustiyani, D., H. Imamuddin, E. N. Faridah dan Oedjijono. 2004. **Pengaruh pH dan Substrat Organik Terhadap Pertumbuhan dan Aktivitas Bakteri Pengoksidasi Amonia.** Biodiversitas vol. 5 no.2.

Aisah, N. 2010. **Formulasi Salep Minyak Atsiri Rimpang Temu Glenyeh (*Curcuma soloensis val.*) Dengan Basis Larut Air Dan Basis Lemak: Sifat Fisik Dan Aktivitas Anti Jamur Candida Albicans Secara In Vitro.** http://one.indokripsi.com. Diakses tanggal 14 Februari.

Austin, B., L. F. Stuckey, P. A. W. Robertson, I. Effendi dan D. R. W. Griffith. 1995. **Short Communication a Probiotic Strain of *Vibrio alginoliticus* Effective in Reducing Disease Caused by *Aeromonas salmonicida, Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli.*** Department of Biological Science. Ecuador.

Afrianto, E. dan E. Liviawaty. 1992. **Pengendalian Hama Dan Penyakit Ikan.** Kanisius. Yogyakarta.

Badjoeri, M. dan Tri, W. 2008. **Penggunaan Bakteri Nitrifikasi untuk Bioremidiasi dan Pengaruhnya Terhadap Konsentrasi Amonia dan Nitrit di Tambak Udang.** Oseanologi dan Limnologi Indonesia 34 (2): 281-276.

Baehaki, A., M. T. Suhartono, N. S. Palupi, dan T. Nurhayati. 2009. **Karakterisasi Protease Dari Bakteri Patogen *S. Aureus* dan *Klebsiella* sp.** Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Balca'zar, J. L. 2003. **Evaluation of Probiotic Bacterial Strains in *Liptopenaeus vannamei.*** Final Report. National Center for Marine and Aquaculture Research. Guayaonil. Ecuador.

Balca'zar, J. L., I. de Blas, I. R. Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell dan J. L. Mu'zquize. 2006. The **Role of Probiotics in Aquaculture.** http://www.elsivier.com. Diakses tanggal 25 November 2010. Pukul 16.30 WIB.

Budi, H. S. 2009. **Probiotic for Aquaculture: Sekilas Tentang Enzim.** http://probioticsforaquaculture.blogspot.com. Diakses tanggal 1 Januari 2011.

Chytanya, R., I. Karunasagar dan I. Karunasagar. 2002. **Inhibition of Shrimp Pathogenic *Vibrios* by a Marine *Pseudomonas* 1-2 Strain.** http://www.elsivier.com. Diakses tanggal 25 November 2010. Pukul 16.45 WIB.

Darmadi. 2009. **Laporan Praktikum Farmakologi.** Marine Science Padjadjaran University. http://www.blogspot.com. Diakses tanggal 25 Desember 2009. Pukul 15.00 WIB.

Dwidjoseputro, D. 1989. **Dasar-Dasar Mikrobiologi.** Djambatan. Malang. 214 hal.

Erold, L. S. dan Stansfield, D. W. 2002. **Teori dan Soal-Soal Genetika Edisi Keempat.** Erlangga. Jakarta.

Fadjar, M., Kilawati, Y., Ni'matuzahro, Awaludin, A., and Kuhn, H. 2009. **Screening and 16s rDNA Identification of *Vibrio harveyi's* Inhibitor Bacteria from Traditional Shrimp Ponds in Bangil, East Java, Indonesia**. Usulan Naskah Artikel.

Faishal. 2008. **Pengertian dan Klasifikasi Probiotik**. http://ardhiborneogemilang.wordpress.com. Diakses tanggal 25 Desember 2009. Pukul 15.00 WIB.

Fardiaz, S. 1992. **Mikrobiologi Pangan 1.** PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Gasperz, V. 1991. **Perancangan Percobaan.** Amico. Bandung. 472 hal.

Gatesoupe, F. J.1999. **The Use of Probiotics in Aquaculture.** Aquaculture 180.

Habib. 2010. **Patogen Ikan.** http://www.blogspot.com. Diakses tanggal 25 November 2010. Pukul 16.45 WIB.

Heritage, J., E.G.V. Erans dan R.A Killington. 1999. **Microbiology In Action.** Cambridge University Press. Cambridge.

Irianto, A. 2005. **Patologi Ikan Teleostei.** Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 256 hal.

Isnansetyo A., M. Horikawa, dan Y. Kamei. 2001. **In Vitro Anti-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Activity of 2,4-diacetylphlorogucinol Produced by *Pseudomonas* sp. AMSN Isolated from a Marine Algae.** Antimicrob Chemother vol. 47.

Jawetz, E., J.L. Manik dan E.A Edelberg. 1982. **Mikirobiologi Untuk Profesi Kedokteran.** CV. E.G.C. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 845 hal.

_____ . 2001. **Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan (Riview of Medical Microbiology)**. CV. E.G.C. Jakarta.

Kabata, Z. 1985. **Parasite and Disesase of Fish Culture In Tropics.** Taylor And Franchis Ltd. London. 318 hal.

Kumar, N. R., dan S. Nair. 2007. ***Vibrio rhizosphaerae* sp. nov., a red-pigmented Bacterium That Antagonizes Phytogenic Bacteria.** International Journal of Systemic and Evaluationary Microbiology. Printed in Great Britain. United of Kingdom.

Kusmiyati, N. W. S. dan Agustiyani. 2007. **Uji Aktifitas Senyawa Antibakteri *Phorphindium quantum*.** Biodiversitas 8(1). 48-53.

Madeali, M. I., Muharijadi A. dan Ahdiah H. 2004. **Efektivitas Pemberian Sel utuh (Whole Cell) Bakteri Vibrio Terhadap Peningkatan Kekebalan Tubuh Udang Windu (Penaeus monodon Fabr.) Dari Serangan White Spot Syndrome Virus (WSSV).** Jurnal Penelitian Indonesia Vol. 10 No. 2. Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros

Mell, S. F., K. Fuller, S. Wimer-Mackin, W. Lencer, dan J. Mekalanos. 2000. **Association of Protease Activity in *Vibrio cholerae* Vaccine Strains With Decreases in Transcelluler Ephithelial Resistance of Polarized T84 Intestinal Ephithelial Cells.** Infect Immune no. 68 vol. 11.

Naziri. 2010. **Penyakit.** http://www.blogspot.com. Diakses tanggal 25 November 2010. Pukul 16.45 WIB.

Nazir. 1988. **Metode Penelitian.** Ghalia. Jakarta. 662 hal.

Nicklin, J., K. G. Cook, T. Pagel dan R. A. Killington. 2003. **Instant Notes in Microbiology.** Publisher Springer. United of Kingdom.

Nurhayati, T., M.T. Suhartono, L. Nuraida, S.B. Poerwanto. 2006. **Karakterisasi Awal Inhibitor Protease dari Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Asal Pulau Panggang, Kepulauan Seribu.** Hayati no. 13 vol. 2.

Pelczar, M. J., E. C. S. Chan dan M. F. Pelczar. 1986. **Dasar-Dasar Mikrobiologi 1.** University Indonesia Pers. Jakarta. 414 hal.

Pelczar, M. J. dan E.C.S. Chan. 1988. **Dasar-Dasar Mikrobiologi 2.** Mc Graw-Hill Book Company. New York. 997 hal.

Poernomo, A. 2004. **Technology of Probiotics to Solve The Problem in Shrimp Pond Culture and The Culture Environment.** Paper Presented in The National Symposium on Development Scientific and Technology Innovation Aquaculture. Patrajas Hotel. Semarang.

Prajitno, A. 2007. **Penyakit Ikan-Udang Bakteri.** Universitas Malang Press. Malang.

Riquelme, C., R. Araya, N. Vergara, A. Rojas, M. Guaita dan M. Candia. 1997. **Potential Probiotics Strains in Culture of The Chilean Scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819).** Aquaculture 154., 17-26.

Schmidt. 1994. **Mikrobiologi Umum** Edisi ke-6. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

Sugianto, B. 2005. **Pemanfaatan Tumbuhan Obat Tradisonal dalam Pengendalian Penyakit Ikan.** Makalah Pribadi Falsafah Sains (PPS-702). http://www.rudyct.com/Pbs702-ipb/10245/budisugianti.pdf. Diakses tanggal 6 Juni 2010. Pukul 16.45 WIB.

Sugita, H., N. Matsuo, Y. Hirose, M. Iwato dan Y. Deguchi. 1997. ***Vibrio* sp. strain NM 10, Isolated From Intestines of Japanese Coastal Fish, has inhibitory Effect Against *Pasteurella piscida*.** Appl. Environ Microbial vol 63.

Sutjiati, M. 1990. **Penyakit Ikan.** Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.

Soranta, E. W. 2009. **Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica Papaya L*) Terhadap *Escherichia coli* Dan *Staphylococcus aureus* Multiresisten Antibiotik.** Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah. Surakarta.

Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos dan W. Verstraete. 2000. **Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture.** American Sociaty for Microbiology.

Volk, Wesley A. dan Margaret F. Wheeler, 1993. **Mikrobiologi Dasar**. Edisi ke-5. Jilid 1. Erlangga. Jakarta. 396 hal.

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_1, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan – Universitas Brawijaya Malang.

Zubaidah, E., D. Widyaningtyas dan M. Nur. 2006. **Mikrobiologi Umum.** Diktat Kuliah. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Laporan Hasil Uji Bakteri *A. hydrophila*

KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
LABORATORIUM PENGUJI
BALAI KARANTINA IKAN KELAS I JUANDA

KAN
Komite Akreditasi Nasional
Laboratorium Penguji
LP – 387 – IDN

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.0136/I/BKIJ/IV/2010

KODE SAMPEL *Sampel Code*	:0136
NAMA/JENIS SAMPEL *Type of Sample*	:Isolat
NAMA PELANGGAN *Customer*	:Neni
ALAMAT *Address*	:Mahasiswa Unibraw Malang
TANGGAL PENERIMAAN *Received Date*	:01 April 2010
TANGGAL ANALISA *Date of Analysis*	:01-04 April 2010
PARAMETER ANALISA *Analysis of Parameters*	:Identifikasi spesies Bakteri
SPESIFIKASI METODE *Method Spesification*	:Konvensional
HASIL ANALISA *Test Result*	:

NO	KODE SAMPEL *Sample Code*	HASIL IDENTIFIKASI *Result Identification*
1.	0136	Aeromonas hydrophyla

CATATAN / *Note* : Analisa dengan Metode Konvensional
Conventional method analysis

Surabaya, 21 Januari 2011
Penanggung jawab Lab BAkteriologi,

KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN – PUSAT KARANTINA IKAN – BALAI KARANTINA IKAN KELAS I JUANDA – REPUBLIK INDONESIA

Laminem, S.Pi.MP
NIP. 19701206 199203 2 002

Lampiran 2. Data Perhitungan Diameter Daerah Hambat Bakteri *Aeromonas hydrophila*

A. Diameter Daerah Hambat pada Masing-Masing Perlakuan

Perlakuan (%)	Diameter Daerah Hambat (mm)			Total	Rata-rata
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
K	6	6	6	18	6
A	7	7,5	8,5	23	7,667
B	8	8	9	25	8,333
C	8	8,5	9	25,5	8,5
D	8,5	8,5	9	26	8,667
				∑ = 117,5	

B. Perhitungan Jumlah Kuadratik

Faktor Koreksi $= G^2/n$

$= 117{,}5^2/15$

$= 920{,}417$

JK Total $= ((K_1)^2 + (K_2)^2 + ... + (D_1)^2) - FK$

$= ((6)^2 + (6)^2 + (6)^2 + (7)^2 + ...+ (9)^2) - FK$

$= (36 + 36 + 36 + 49 + ... + 81) - 920{,}417$

$= 937{,}25 - 920{,}417$

$= 16{,}833$

JK Perlakuan $= ((\sum K)^2 + (\sum A)^2 + (\sum B)^2 + (\sum C)^2 + (\sum D)^2)/ 3 - FK$

$= ((18)^2 + (23)^2 + (25)^2 + (25{,}5)^2 + (26)^2/ 3 - 920{,}147$

$= (324 +529 + 625 + 650{,}25 + 676)/ 3 - 920{,}417$

$= (2804{,}25/ 3) - 920{,}417$

$= 934{,}75 - 920{,}417$

$= 14{,}333$

JK Acak = JK Total – JK Perlakuan

$= 16{,}833 - 14{,}333$

$= 2{,}5$

Lampiran 2. (Lanjutan)

C. Analisa Sidik Ragam

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F Hitung	F 5 %	F 1 %
Perlakuan	4	14,333	3,583	14,332 **	3,48	5,99
Acak	10	2,5	0,25			
Total	14					

Keterangan:

F Hitung < F 5% = tidak berbeda nyata (non significant)

F 5%< F Hitung < F 1% = berbeda nyata (*)

F Hitung > F 1% = berbeda sangat nyata (**)

Karena F Hitung > F 1% maka perlakuan pemberian supernatan *Vibrio* sp. dengan konsentrasi yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap diameter daerah hambat bakteri *Aeromonas hydrophila*.

D. Uji BNT untuk 5% dan 1%

SED $= \sqrt{\frac{2\,KT\,Acak}{ulangan}}$

$= \sqrt{\frac{2 \times 0,25}{3}}$

= 0,439

BNT 5% = t 5% (db acak) x SED

= 2,228 x 0,439

= 0,978

BNT 1% = t 1% (db acak) x SED

= 3,169 x 0,439

= 1,319

Lampiran 2. (Lanjutan)

E. Tabel Uji Beda Nyata Terkecil

Rataan	K = 6	A = 7,667	B = 8,333	C = 8,5	D = 8,667	Notasi
K = 6	-					A
A = 7,667	1,667 ns	-				AB
B = 8,333	2,333 **	0,666 ns	-			BC
C = 8,5	2,5 **	0,833 ns	0,167 ns	-		BC
D = 8,667	2,667 **	1**	0,334 ns	0,167 ns	-	C

Urutan perlakuan terbaik adalah perlakuan D → C/B → A → K

F. Tabel Analisa Regresi

Perlakuan (x)	Data (Ti)	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	Kuartik
0%	18	-2	+2	-1	+1
12,5%	23	-1	-1	+2	-4
25%	25	0	-2	0	+6
37,5%	25,5	+1	-1	-2	-4
50%	26	+2	+2	+1	+1
$Q=\sum(Ci*Ti)$		18,5	-10,5	3	0
$Kr=(\sum Ci^2)r$		30	42	30	210
$JK=Q^2/Kr$		11,408	2,625	0,3	0

G. Tabel Analisa Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	14,333	-	-		
Linier	1	11,408	11,408	45,63 **	4,96	10,04
Kuadratik	1	2,625	2,625	10,5 **		
Kubik	1	0,3	0,3	1,2 ns		
Kuartik	1	0	0	0 ns		
Acak	10	2,5	0,25	-		
Total	14					

Lampiran 2. (Lanjutan)

Keterangan:

F Hitung < F 5% = tidak berbeda nyata (*non significant*)

F 5% < F Hitung < F 1% = berbeda nyata (*)

F Hitung > F 1% = berbeda sangat nyata (**)

H. Koefisien Determinasi:

R^2 Linier $= \frac{11,408}{(11,408)+(0,25)}$

= 0,978

r = 0,989

R^2 Kuadratik $= \frac{2,625}{(2,625)+(0,25)}$

= 0,913

r = 0,955

Berdasarkan daftar sidik ragam regresi dan nilai koefisien determinasi maka bentuk regresi yang paling sesuai adalah Regresi Linier, karena memiliki nilai yang paling besar. R^2 linier > R^2 kuadratik, jadi regresi linier lebih sesuai dengan kurva respon.

Persamaan Regresi Linier dengan Rumus $Y= b_0 + b_1X$

Persamaan Umum : $Y = b_0 + b_1x$

Perlakuan	X (Konsentrasi)	Rata-rata (mm)	x.y	x^2
	X	Y		
K	0	6	0	0
A	12,5	7,667	95,873	156,25
B	25	8,333	208,325	625
C	37,5	8,5	318,75	1406,25
D	50	8,667	433,35	2500
	$\sum x = 125$	$\sum y = 39,167$	$\sum x.y = 1056,263$	$\sum x^2 = 4687,5$
	$\bar{x} = 25$	$\bar{y} = 7,833$		

Lampiran 2. (Lanjutan)

$$b_1 = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$= \frac{1056{,}263 - \frac{125 * 39{,}167}{5}}{4687{,}5 - \frac{(125)^2}{5}}$$

$$b_1 = \frac{1056{,}25 - \frac{4895{,}875}{5}}{4687{,}5 - \frac{15625}{5}}$$

b_1 = 0,049

b_0 = $\overline{y} - b_1\overline{x}$

= 7,833 – (0,049) * (25)

b_0 = 6,608

Y = $b_0 + b_1x$

Y = 6,608 + 0,049x

Sehingga persamaan yang diperoleh :

y = 6,608 + 0,049x

Jadi, untuk x = 0 maka y = 6,608 + 0,049(0) = 6,608

x = 12,5 maka y = 6,608 + 0,049(12,5) = 7,22

x = 25 maka y = 6,608 + 0,049(25) = 7,833

x = 37,5 maka y = 6,608 + 0,049(37,5) = 8,445

x = 50 maka y = 6,608 + 0,049(50) = 9,058

Lampiran 3. Cara Perhitungan Konsentrasi *Vibrio* sp

Pengenceran menggunakan Rumus : $\mathbf{N_1 * V_1 = N_2 * V_2}$.

Keterengan : N_1 = Konsentrasi yang digunakan,

V_1 = Volume konsentrasi supernatan *Vibrio* sp. yang diperlukan,

N_2 = Konsentrasi stok supernatan *Vibrio* sp. (100%) dan

V_2 = Volume yang digunakan (2 ml).

1. Konsentrasi 12,5%

   12,5% * 2 ml = 100 % * V_1

   $V_1 = \frac{12,5\% \times 2ml}{100\%}$ = 0,25 ml

2. Konsentrasi 25%

   25% * 2 ml = 100% * V_1

   $V_1 = \frac{25\% \times 2ml}{100\%}$ = 0,5 ml

3. Konsentrasi 37,5%

   37,5% * 2 ml = 100% * V_1

   $V_1 = \frac{37,5\% \times 2ml}{100\%}$ = 0,75 ml

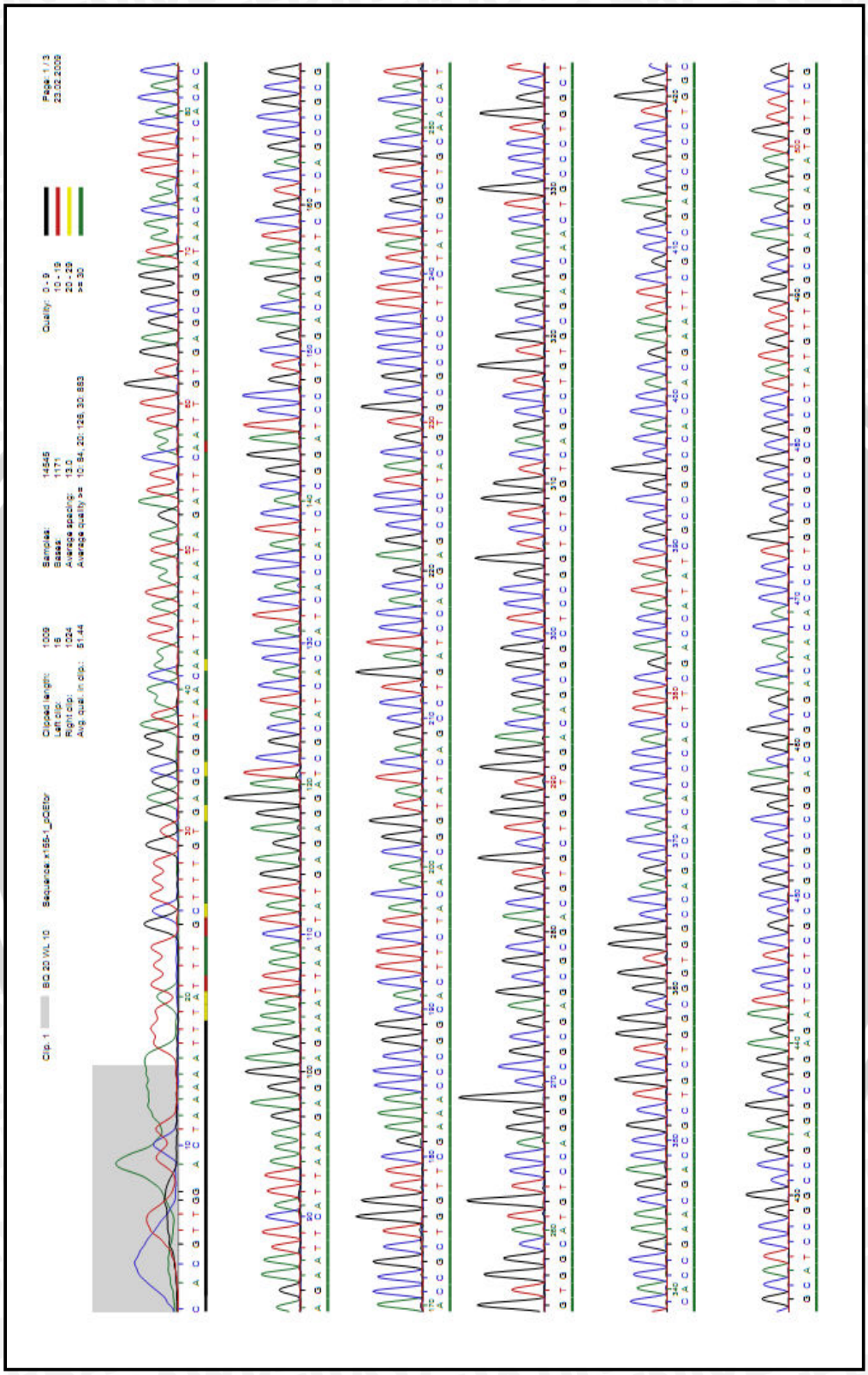
4. Konsentrasi 50%

   50 % * 2 ml = 50% * V_1

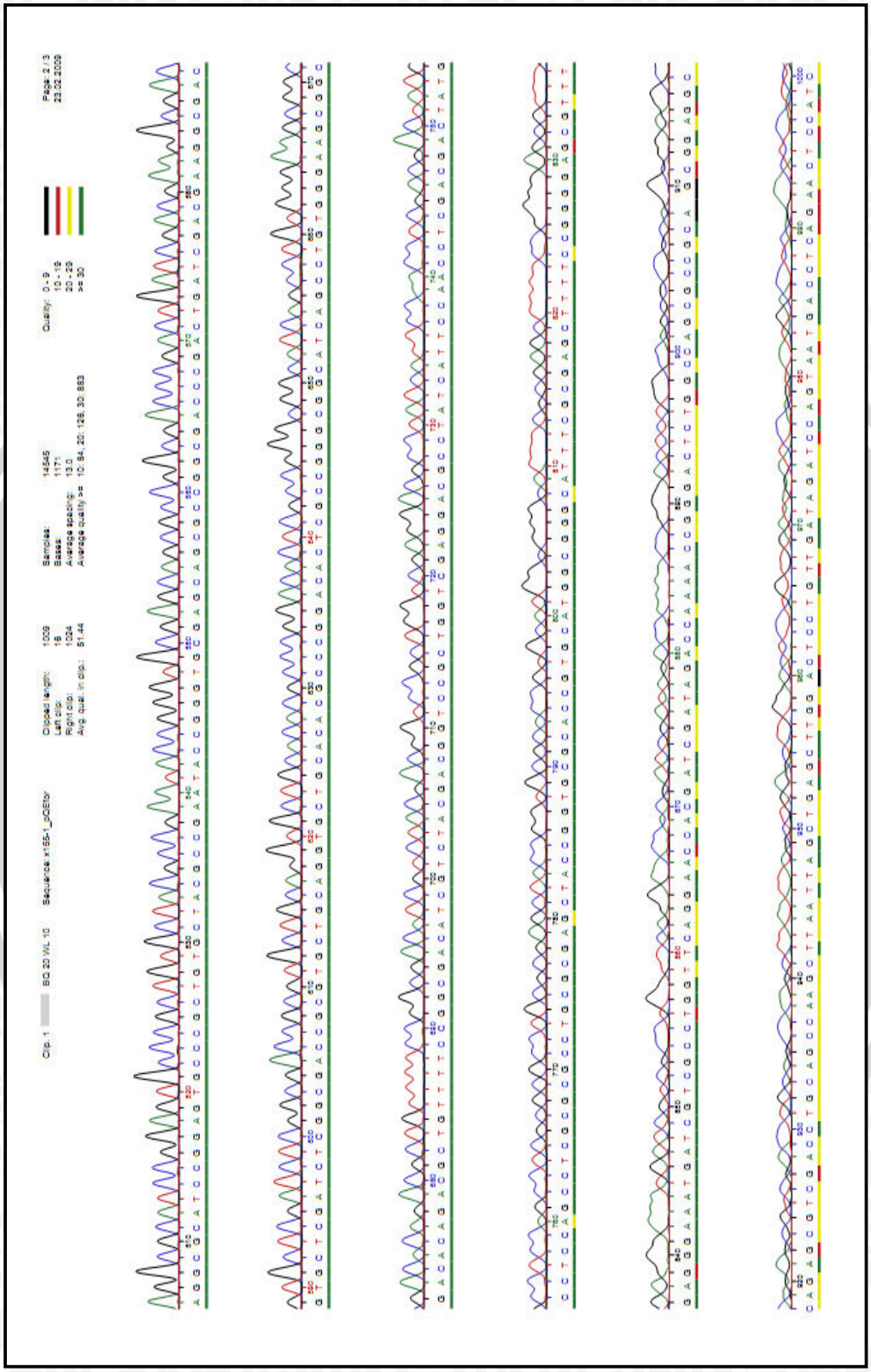
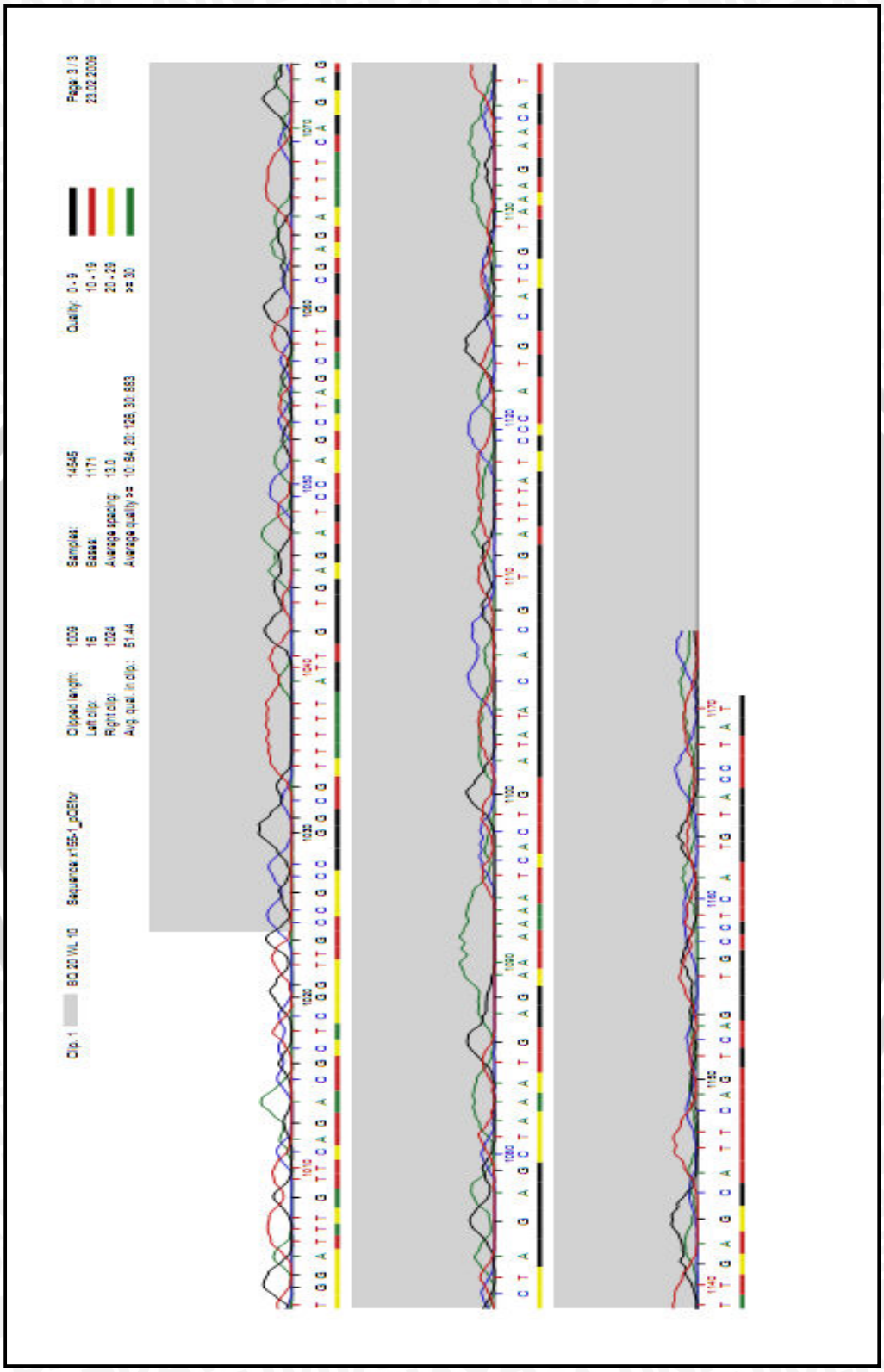
   $V_1 = \frac{50\% \times 2ml}{100\%}$ = 1 ml

Volume aquadest = 2 ml - volume konsentrasi supernatan *Vibrio* sp.

Lampiran 4. Hasil Sequensing 16S rDNA *Vibrio* sp.



Lampiran 4. (Lanjutan)



Lampiran 4. (Lanjutan)