

**POTENSI ANTAGONISTIK BAKTERIN *Vibrio alginolyticus* TERHADAP  
*Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO**

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

Oleh :  
**LIZA FIBRIYANI AFANDI  
NIM. 0410850051**



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

**POTENSI ANTAGONISTIK BAKTERIN *Vibrio alginolyticus* TERHADAP  
*Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan  
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya**

Oleh :  
**LIZA FIBRIYANI AFANDI**  
NIM. 0410850051

**DOSEN PENGUJI I**

**(YUNITA MAIMUNAH, S.Pi, M.Sc)**  
NIP. 19780625 200501 2 002  
TANGGAL :

**DOSEN PEMBIMBING I**

**(Dr. Ir. MAFTUCH, MSi)**  
NIP. 19660825 199203 1 001  
TANGGAL :

**DOSEN PENGUJI II**

**(Ir. M. RASYID FADHOLI, MSi)**  
NIP. 19520713 198003 1 001  
TANGGAL :

**DOSEN PEMBIMBING II**

**(Ir. ELLANA SANOESI, MP)**  
NIP. 19630924 199803 2 002  
TANGGAL :

**MENGETAHUI,  
KETUA JURUSAN**

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

## RINGKASAN

**LIZA FIBRIYANI AFANDI.** Skripsi tentang Potensi Antagonistik Bakterin *Vibrio alginolyticus* Terhadap *Vibrio harveyi* Secara *in Vitro* (Dibawah bimbingan Dr. Ir. Maftuch, M.Si dan Ir. Ellana Sanoesi, MP).

---

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juli - Agustus 2010.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh bakterin dari bakteri *V. alginolyticus* terhadap penghambatan bakteri *V. harveyi* secara *in vitro*.

Kegunaan penelitian ini dapat menjadi sumber informasi guna mengetahui kemampuan bakterin *V. alginolyticus* dalam menghambat pertumbuhan dari *V. harveyi*

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen, yaitu suatu bentuk kegiatan penelitian yang dilakukan untuk mencari hubungan sebab akibat (hubungan kausal) antara dua variabel yang sengaja ditimbulkan oleh peneliti dengan maksud untuk melihat akibat dari suatu perlakuan. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dengan 3 perlakuan dan 3 ulangan yaitu pemberian bakterin *V. alginolyticus* dengan dosis 0%, 50% dan 100%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakterin *V. alginolyticus* mempunyai potensi antagonistik terhadap *V. harveyi* yaitu dengan terbentuknya daerah hambat disekeliling kertas cakram. Berdasarkan hasil analisa keragaman menunjukkan bahwa pemberian bakterin *V. alginolyticus* mempunyai pengaruh yang sangat nyata terhadap besarnya daerah hambat. Semakin tinggi konsentrasi bakterin *V. alginolyticus* yang diberikan maka daerah hambat yang terbentuk semakin besar. Hal ini dapat dibuktikan bahwa rata-rata daerah hambat pada konsentrasi 100% sebesar 9,3 mm lebih besar bila dibandingkan dengan konsentrasi 50% sebesar 7,0 mm. Hasil analisa regresi antara konsentrasi bakterin *V. alginolyticus* dengan daerah hambat menunjukkan bahwa nilai  $R^2 = 0,950$  dengan persamaan  $y = 0,033x + 5,783$ .

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bakterin *V. alginolyticus* memiliki potensi antagonistik karena mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* dengan terbentuknya daerah bening disekitar kertas cakram dengan rata-rata diameter daerah hambat tertinggi sebesar 9,3 mm pada konsentrasi 100%. Sebagai tindak lanjut dari penelitian ini disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan tentang bakterin *V. alginolyticus* sebagai salah satu bahan imunostimulan dalam upaya pencegahan penyakit bakteri *V. alginolyticus* secara *in vivo*.

## KATA PENGANTAR

Puji dan Syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul : POTENSI ANTAGONISTIK BAKTERIN *Vibrio alginolyticus* TERHADAP *Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan, arahan, saran dalam penyelesaian laporan skripsi ini teristimewa kepada :

1. Bapak Dr. Ir. Maftuch, MSi, selaku Dosen Pembimbing I.
2. Ibu Ir. Ellana Sanoesi, MP, selaku Dosen Pembimbing II.
3. Ibu Yunita Maimunah, S.Pi, M.Sc selaku Dosen Penguji I.
4. Bapak Ir. M. Rasyid Fadholi, MSi, selaku Dosen Penguji II.
5. Semua pihak yang telah membantu dan mendorong penulis dalam penyelesaian laporan ini.

Penulis menyadari akan keterbatasan dan kemampuan yang dimiliki sehingga dalam penyusunan laporan ini masih banyak kekurangan dan kekeliruan. Oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkannya.

Malang, Oktober 2010

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

<b>COVER</b>	
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b>	
<b>RINGKASAN</b> .....	i
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	ii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	iii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	v
<b>DAFTAR GAMBAR</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 .....	4
1.4 Kegunaan Penelitian .....	4
1.5 Hipotesis .....	4
1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian .....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
2.1 Bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	5
2.1.1 Klasifikasi .....	5
2.1.2 Morfologi .....	5
2.1.3 Habitat dan Penyebaran .....	6
2.1.4 Patogenitas Bakteri <i>Vibrio sp</i> .....	7
2.2 Bakteri <i>Vibrio harveyi</i> .....	8
2.2.1 Klasifikasi .....	8
2.2.2 Morfologi .....	8
2.2.3 Habitat dan Penyebaran .....	8
2.2.4 Patogenitas Bakteri <i>V. harveyi</i> .....	9
2.2.5 Infeksi dan Tanda-tanda Penyerangan .....	9
2.3 Antagonisme Antar Bakteri .....	10
2.4 Uji Efektivitas Anti Mikroba Secara In Vitro .....	12
2.4.1 Cara Cakram .....	12
<b>3. MATERI DAN METODE PENELITIAN</b> .....	14
3.1 Materi Penelitian .....	14
3.1.1 Peralatan Penelitian .....	14
3.1.2 Bahan Penelitian .....	14
3.2 Metode dan Rancangan Penelitian .....	14
3.2.1 Metode Penelitian .....	14
3.2.2 Rancangan Penelitian .....	14
3.3 Prosedur Penelitian .....	16
3.3.1 Persiapan Alat .....	16
A. Sterilisasi alat dan bahan .....	16
B. Pembuatan Media .....	17

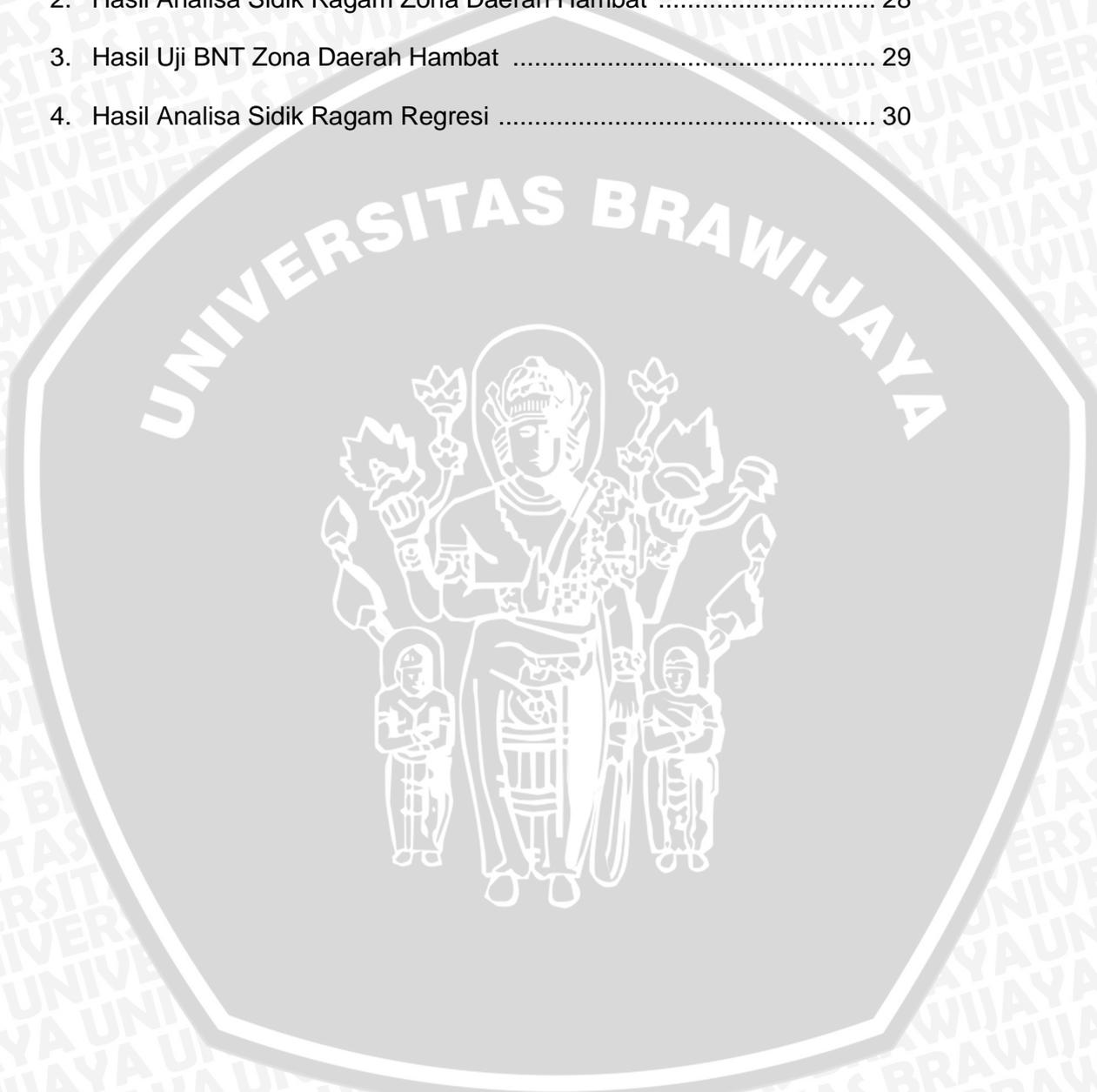


3.3.2 Pelaksanaan Penelitian.....	18
A. Pembuatan Biakan Bakteri <i>V. alginolyticus</i> dan <i>V. harveyi</i> .	18
B. Pewarnaan Gram.....	18
C. Perbanyakkan Bakteri.....	19
D. Pembuatan Bakterin .....	19
E. Pembuatan Konsentrasi Bakterin .....	19
F. Uji Tantang Bakterin.....	19
3.4 Parameter Penelitian .....	21
3.5 Analisa Data .....	21
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>22</b>
4.1 Kultur Bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i> dan <i>Vibrio harveyi</i> .....	22
4.2 Hasil pembuatan Bakterin <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	23
4.3 Penentuan Konsentrasi Bakterin Untuk Uji Tantang.....	24
4.4 Uji Tantang dengan Kertas Cakram .....	24
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>32</b>
5.1 Kesimpulan .....	32
5.2 Saran .....	32
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>33</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>36</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Pengukuran Zona Daerah Hambat .....	27
2. Hasil Analisa Sidik Ragam Zona Daerah Hambat .....	28
3. Hasil Uji BNT Zona Daerah Hambat .....	29
4. Hasil Analisa Sidik Ragam Regresi .....	30



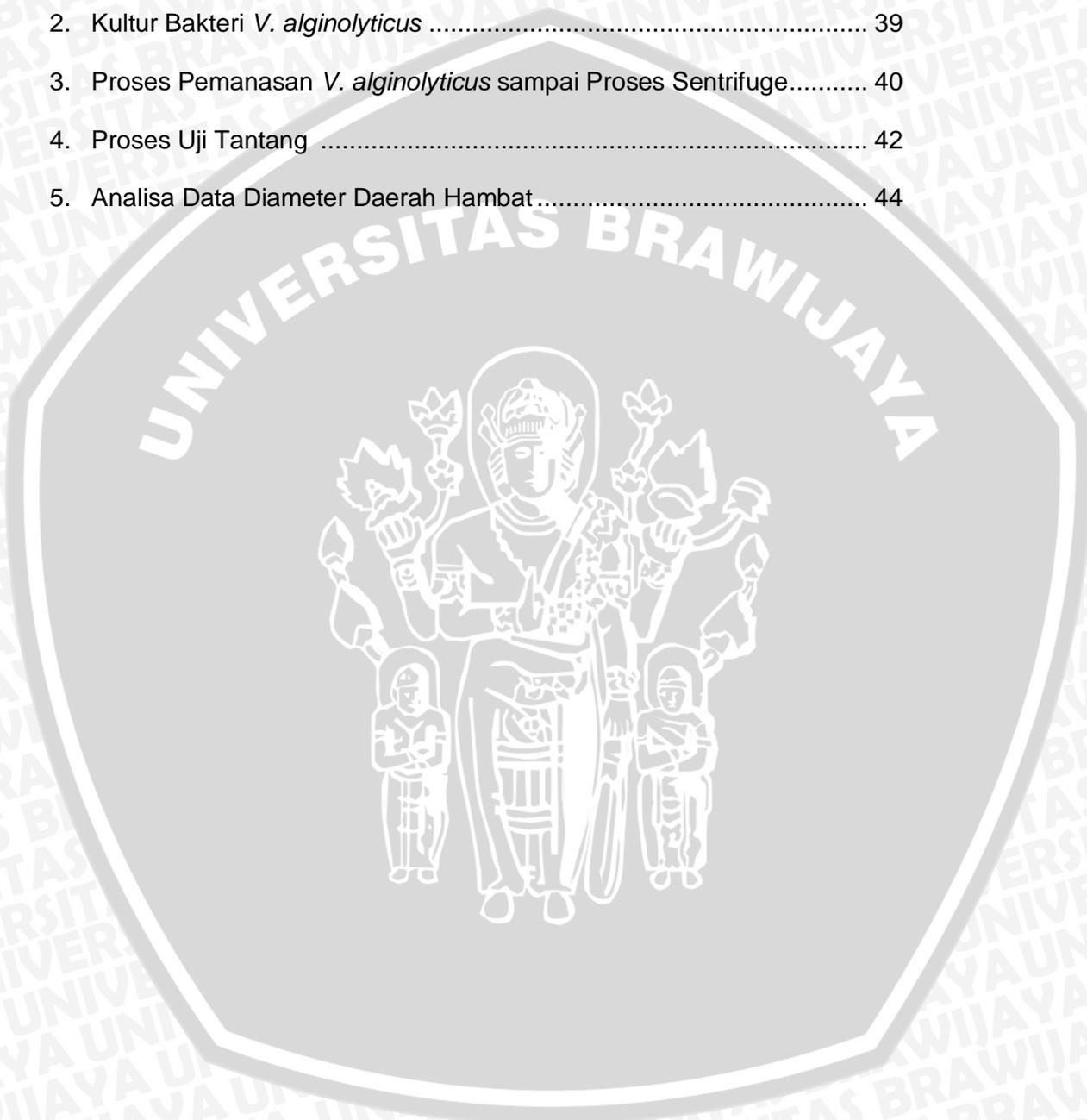
## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Penempatan Perlakuan Acak .....	16
2. Cara Pengukuran Zona Hambat dengan Metode Kertas Cakram .....	21
3. Kultur Bakteri <i>V.alginolyticus</i> dan <i>V.harveyi</i> pada Media TCBSA .....	22
4. Hasil Pewarnaan <i>V.alginolyticus</i> dan <i>V. harveyi</i> .....	23
5. Hasil Proses Sentrifuge .....	24
6. Hasil Uji Tantang Bakterin <i>V. alginolyticus</i> Terhadap <i>V. harveyi</i> .....	25
7. Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Bakterin <i>V. Alginolyticus</i> dengan Diameter Daerah Hambat .....	30



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Peralatan Penelitian .....	36
2. Kultur Bakteri <i>V. alginolyticus</i> .....	39
3. Proses Pemanasan <i>V. alginolyticus</i> sampai Proses Sentrifuge.....	40
4. Proses Uji Tantang .....	42
5. Analisa Data Diameter Daerah Hambat.....	44



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit merupakan salah satu kendala dalam keberhasilan produksi. Penyakit pada ikan dan udang diklasifikasikan dalam dua kelompok, yaitu penyakit non infeksi dan penyakit infeksi. Penyakit non infeksi yaitu penyakit yang disebabkan oleh gangguan non patogen seperti nutrisi, kualitas air, racun dan penanganan sedangkan penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh organisme patogen seperti jamur, bakteri dan virus, sehingga dapat menular dari satu inang ke inang yang lain (Murdjani *et al.*, 2003).

Penyakit adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan baik secara langsung maupun tidak langsung. Gangguan terhadap ikan dan udang dapat disebabkan oleh organisme lain, pakan maupun kondisi lingkungan yang kurang menunjang kehidupan udang dan ikan (Sachlan, 1972 *dalam* Afrianto dan Liviawati, 1992).

Kendala utama dalam usaha budidaya ikan adalah terserangnya penyakit. Timbulnya penyakit dalam tubuh ikan merupakan suatu hasil interaksi yang tidak serasi antara ikan, lingkungan dan patogen. Selain itu timbulnya penyakit juga dipengaruhi oleh kondisi ikan dan cara penyerangan dari organisme penyebab penyakit. Penyakit ikan dapat disebabkan oleh virus, bakteri, parasit atau zat-zat kimia pencemar yang mengganggu proses metabolisme di dalam tubuh ikan. Beberapa jenis penyakit yang menyerang, penyakit bakterial merupakan penyakit yang banyak menyebabkan kegagalan panen (Prajitno, 2007).

Penyakit merupakan masalah utama dan sangat serius yang umumnya menyerang ikan-ikan laut adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* (Denkin *et al.*, 2004). Penularannya dapat melalui air atau kontak langsung antar ikan dan menyebar sangat cepat pada ikan-ikan yang dipelihara dengan kepadatan

tinggi. Infeksi *Vibriosis* menyebabkan diskolorasi, erithema disekitar sirip, perut dan mulut. Juga ditemui luka nekrotik otot perut, saluran intestinal, rectum menjadi terbelah, dan mortalitas hingga mencapai 30-100%. Kondisi tersebut menyebabkan penyakit ini perlu mendapatkan perhatian dan penanganan secara khusus. Timbulnya serangan penyakit ikan di kolam merupakan hasil interaksi yang tidak serasi antara ikan, kondisi lingkungan dan organisme penyakit. Interaksi yang tidak serasi ini telah menyebabkan stres pada ikan, sehingga mekanisme pertahanan diri yang dimilikinya menjadi lemah dan akhirnya mudah diserang oleh penyakit (Prajitno, 2005)

*Vibriosis* merupakan salah satu penyakit yang sering terjadi pada usaha budidaya udang yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* sp dan sering dikatakan sebagai penyakit udang menyala karena udang yang terinfeksi terlihat bercahaya pada malam hari (Tompo, *et al* 2004). Infeksi oleh *Vibrio luminesens* salah satunya yaitu *Vibrio harveyi* telah terbukti menyebabkan kerugian besar, terutama pada wabah yang terjadi pada awal 90-an dan berlangsung hingga beberapa tahun kemudian (Irianto, 2003).

Berbagai upaya penanggulangan yang telah banyak dilakukan adalah dengan pencegahan atau pengobatan. Antibiotik umumnya digunakan untuk mengobati infeksi bakteri, namun sayang penggunaan antibiotik secara terus menerus akan menimbulkan masalah yaitu timbulnya resistensi, penimbunan residu obat-obatan didalam tubuh ikan atau udang, maupun pencemaran lingkungan yang akhirnya dapat mempengaruhi organisme perairan lainnya (Prajitno, 2007).

Bahan pengendali yang tidak merusak lingkungan dan sering digunakan di bidang perikanan adalah vaksin, probiotik dan bahan aktif lainnya (Austin, 2004; Elis, 1988 *dalam* Maftuch, 2006). Penelitian Garriques dan Arevalo (1995) *dalam* Sumisdyanto (2009) menyimpulkan bahwa bakteri ini mempunyai suatu karakter yang bisa melindungi dari serangan penyakit. Selain itu menurut Maftuch (2006),

Outer Membran Protein (OMP) dari *V. alginolyticus* dengan berat molekul 42,95 KDa dapat dibuat sebagai kandidat vaksin.

Berdasarkan uraian diatas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah bakterin *V. alginolyticus* mempunyai kemampuan atau potensi dalam menghambat pertumbuhan *V. harveyi* dan penelitian ini merupakan langkah awal untuk penelitian selanjutnya dalam upaya pencegahan penyakit.

## 1.2 Perumusan Masalah

Bakteri yang perlu diwaspadai dalam budidaya udang diantaranya adalah bakteri *vibrio*. Namun demikian ada beberapa hal yang dapat dilakukan sebagai upaya pengendalian untuk meminimalkan penyakit, salah satunya adalah aplikasi probiotik (Haliman dan Adiwijaya, 2005).

Irianto (2003), menyatakan bahwa pengendalian penyakit oleh probiotik telah diupayakan sejak lama, namun masih bersifat dugaan dan belum pasti. Probiotik dianggap menguntungkan karena mampu menekan populasi mikroba merugikan melalui kompetisi dengan memproduksi senyawa-senyawa anti mikroba atau melalui kompetisi nutrisi.

Menurut Shickney dalam Hatmanti dkk (2009), penyakit yang disebabkan oleh bakteri yang sering menyerang ikan kerapu adalah *Vibrio sp.*, *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pasteurella sp.* dan *Mycobacterium sp.* menyatakan bahwa cara yang sering dilakukan untuk membasmi bakteri patogen ialah dengan menggunakan antibiotik, namun penggunaan antibiotik ternyata dapat menimbulkan efek samping yaitu dapat menjadikan bakteri patogen menjadi resisten. Oleh karena itu, perlu dilakukan pencarian metode lain yang aman bagi biota dan lingkungannya. Salah satunya adalah dengan memanfaatkan sifat antagonisme antibakteri atau antar komunitas bakteri.

Berdasarkan uraian tersebut di atas, maka dilakukan penelitian untuk menjawab permasalahan pada penelitian ini apakah bakterin dapat menghambat perkembangan *V. harveyi* secara in vitro?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh bakterin dari bakteri *V. alginolyticus* terhadap penghambatan bakteri *V. harveyi* secara in vitro.

### 1.4 Kegunaan Penelitian.

Hasil penelitian ini diharapkan akan menjadi sumber informasi dalam mengetahui daya hambat yang terjadi pada uji cakram bakterin *V. alginolyticus* dalam menghambat pertumbuhan dari *V. harveyi*.

### 1.5 Hipotesis

Ho: Diduga bakterin *V. alginolyticus* dengan konsentrasi yang berbeda tidak mempunyai potensi antagonistik terhadap bakteri *V. harveyi* secara in vitro

H1: Diduga bakterin *V. alginolyticus* dengan konsentrasi yang berbeda mempunyai potensi antagonistik terhadap bakteri *V.harveyi* secara in vitro

### 1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dan Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, pada bulan Juli - Agustus 2010.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Bakteri *Vibrio alginolyticus*.

#### 2.1.1 Klasifikasi Bakteri *V. alginolyticus*.

Klasifikasi *Vibrio alginolyticus* berdasarkan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 9 tahun 1994 dalam Maftuch (2006), yaitu :

Divisio : Bakteri

Class : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales

Family : Vibrionaceae

Genus : *Vibrio*

Spesies : *Vibrio alginolyticus*

#### 2.1.2 Morfologi *V. alginolyticus*.

*V.alginolyticus* dicirikan dengan pertumbuhannya yang bersifat bergerombol (*Swarm*) pada media padat selektif. Ciri yang lain adalah gram negatif, motil, bentuk batang, fermentasi glukosa, laktosa, sukrosa dan maltosa, membentuk koloni berukuran 0.8-1.2 cm yang berwarna kuning pada media TCBSA (*Thiosulfat Citrate Bisesalt Sucrose Agar*) (Noel and John, 1984).

Kemampuan *V. alginolyticus* dalam meragi sukrosa digunakan untuk membedakannya dari *V. parahaemolyticus*. Langkah pertama katabolisme sukrosa pada *V. alginolyticus* menunjukkan bahwa sukrosa secara aktif ditranspor oleh potensi elektrokimia  $\text{Na}^+$ , kemudian intraselulernya dihidrolisa ke glukosa dan fruktosa oleh sukrosa. Sifat-sifat pertumbuhan yaitu meragikan sukrosa dan manosa tetapi tidak meragikan arabinosa. Uji oksidasi positif merupakan langkah kunci identifikasi awal *V. alginolyticus* dan spesies *vibrio* lainnya. Kebanyakan spesies *Vibrio* tahan terhadap garam dan pertumbuhannya sering dirangsang oleh NaCl (Brooks *et al.*, 2001).

Sifat lain yang tidak kalah penting adalah sifat proteolitik yang berkaitan dengan mekanisme infeksi bakteri. Karakteristik fisika-biokimia adalah pewarnaan gram negatif, dan mempunyai sifat fermentatif, katalase, oksidase, methyl red dan H<sub>2</sub>S glukosa, laktosa, dan manitol positif. Sedangkan sellobiosa, fruktosa, galaktosa negatif (Feliatra, 1999).

### 2.1.3 Habitat dan Penyebaran *V. alginolyticus*.

Bakteri *Vibrio* merupakan genus yang dominan pada lingkungan air payau dan estuari. Umumnya bakteri *Vibrio* menyebabkan penyakit pada hewan perairan dan payau. Sejumlah spesies *Vibrio* yang dikenal sebagai patogen seperti *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. carchariae*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. ordalii*, *V. vulnificus*. *Vibrio sp.* menyerang lebih dari 40 spesies ikan di 16 negara (Feliatra, 1999).

Bakteri dari spesies *Vibrio* secara langsung akan menimbulkan penyakit (patogen), yang dapat menyebabkan kematian biota laut yang menghuni perairan, dan secara langsung bakteri yang terbawa biota laut seperti ikan akan dikonsumsi oleh manusia, sehingga menyebabkan penyakit pada manusia. *V. alginolyticus* mampu menggunakan sejumlah sumber karbon dan energi tanpa membutuhkan vitamin atau *growth factor*, dan banyak juga yang hidup pada kisaran suhu 4 – 42°C dan dapat menetap selama berminggu-minggu dalam lingkungan basah dengan sedikit atau tanpa makanan. Karakteristik ini menjelaskan mengapa *vibrio* merupakan sebuah patogen oportunistik yang efektif (Brongden *et al.*, 2000). *Vibrio* bersifat oksidase-positif, yang tumbuh pada pH yang sangat tinggi 8,9 – 9,5 dan dengan cepat dapat dibunuh oleh asam.

Menurut Dwijoseputro (1989), pada umumnya bakteri hanya mengenal satu macam pembiakan saja, yaitu pembiakan secara aseksual atau vegetatif. Pelaksanaan pembiakan yaitu dengan pembelahan diri atau *devisio*.

Menurut Dwijoseputro (1989), 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, di tengah-tengah sering ketinggalan suatu lubang kecil. Dimana protoplasma kedua sel baru masih tetap berhubungan. Hubungan protoplasma itu disebut *plasmodesmida*.
- Fase yang terakhir yaitu ditandai dengan terpisahnya kedua sel. Ada bakteri yang segera berpisah yaitu yang satu terlepas sama sekali dari yang lain, setelah dinding melintang menyekat secara sempurna. Bakteri yang semacam ini merupakan koloni yang merata jika dipelihara pada medium padat. Sebaliknya, bakteri-bakteri yang dindingnya lebih kokoh itu tetap bergandeng-gandengan setelah pembelahan.

#### **2.1.4 Patogenitas Bakteri *Vibrio sp.***

Patogenitas adalah kemampuan bakteri untuk menyebabkan suatu penyakit (Jewetz, *et al.*, 2001 dalam Maftuch 2006). Bakteri *Vibrio sp* bersifat oportunistik dan merupakan bakteri yang sangat ganas dan berbahaya pada budidaya air payau dan laut karena dapat bertindak sebagai patogen primer dan sekunder. Sebagai patogen primer bakteri masuk ke dalam tubuh ikan melalui kontak langsung, sedangkan sebagai patogen sekunder bakteri menginfeksi ikan yang telah terserang penyakit lain misalnya parasit. Serangan dapat melalui luka, insang, kulit dan saluran pencernaan (*secondary infection*). Gejala yang ditimbulkan tergantung tingkat serangan, yaitu kronis dan akut (Prajitno, 2005).

Wagiyo (1975) dalam Feliatra (1999) menyebutkan bahwa dampak langsung bakteri patogen dapat menimbulkan penyakit, parasit, pembusukan DNA dan toksin yang dapat menyebabkan kematian biota yang menghuni perairan

tersebut. Beberapa jenis *Vibrio* sp. yang bersifat patogen mengeluarkan toksin ganas dan seringkali mengakibatkan kematian pada manusia dan hewan.

## 2.2 Bakteri *Vibrio harveyi*

### 2.2.1 Klasifikasi bakteri *V. harveyi*

Berdasarkan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology volume 9 tahun 1994 dalam Maftuch (2006), *V. harveyi* diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi : Protophyta

Kelas : Schizomycetes

Ordo : Eubacterials

Famili : Pseudomonadaceae

Genus : *Vibrio*

Spesies : *Vibrio harveyi*

### 2.2.2 Morfologi Bakteri *V. harveyi*.

Ciri bakteri *V. harveyi* adalah bentuknya seperti batang pendek, tidak membentuk spora, sumbu melengkung atau lurus, ukurannya  $0,51 \mu\text{m} \times 1,0\text{-}2,0 \mu\text{m}$ , bersifat gram negatif, tumbuh baik pada kadar NaCl 1-1,5 %, terdapat tunggal atau kadang-kadang bersatu dalam bentuk s atau spiral (Kabata 1985 dalam Prajitno 2007). Bakteri ini tergolong dalam famili *Vibrionaceae*, yang mempunyai tubuh berbentuk batang dan mempunyai kemampuan untuk bergerak karena dilengkapi dengan flagel (Kordi, 2004 dalam Firdiansyah, 2007).

### 2.2.3 Habitat dan Penyebaran

Menurut Murdjani (2002), penyakit *Vibriosis* mula-mula ditemukan oleh Canesterini pada tahun 1983 di Italia, dan saat ini *Vibriosis* merupakan penyakit yang umum dijumpai dan merupakan masalah yang serius diseluruh usaha budidaya ikan laut dan air payau di dunia. Bakteri ini selain didapatkan di air laut juga dipermukaan air payau. Suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri *Vibrio* sp. berkisar antara 30 – 35 °C, sedangkan pada suhu 4°C dan 45°C bakteri tidak dapat tumbuh dan pada suhu 55°C bakteri akan mati.

Ruby dan Morin (1995) dalam Prajitno (2007), menemukan pertumbuhan terbaik *Vibrio* sp. pada perairan subur dan mempunyai kandungan bahan organik yang tinggi. Sedangkan Shilo dan Yetinson (1995) dalam Prajitno (2007), bakteri *Vibrio* sp berkembang pada perairan yang diperkaya oleh bahan limbah.

#### 2.2.4 Patogenisitas *V. harveyi*.

*V. harveyi* telah diidentifikasi sebagai penyebab penyakit patogen yang serius bagi hewan laut. Misalnya, organisme ini telah dilaporkan sebagai patogen utama pada budidaya udang terutama di Amerika Selatan dan Asia. Selain itu, *V. harveyi* juga sebagai penyakit bagi ikan dan kerang-kerangan (Zhang *et al.*, 2001). *Vibriosis* sering pula dikatakan sebagai penyakit udang menyala, karena udang yang terinfeksi terlihat bercahaya pada malam hari (Prajitno, 2007).

Patogenisitas adalah kemampuan organisme untuk menimbulkan penyakit mikroorganisme menyerang inang yaitu ketika mikroorganisme menyerang inang memasuki jaringan tubuh dan berkembang biak di situ, maka terjadilah infeksi (Pelczar and Chan, 1988).

#### 2.2.5 Infeksi dan Tanda- tanda Penyerangan

Adapun sifat pathogenitas bakteri *Vibrio* menurut Prajitno (2005) adalah :

- Serangan terjadi secara cepat dan menimbulkan kematian total.
- Udang yang terserang biasanya hancur sehingga bangkainya tidak kelihatan.
- Bakteri ini dapat memusnahkan larva dalam waktu 1-2 hari sejak serangan awal.
- Bakteri ini mudah menular (melalui pakan, air, peralatan maupun aktivitas manusia)
- Bakteri ini dapat menyerang sepanjang tahun tetapi cenderung terjadi pada saat perubahan iklim atau suhu yang mendadak.

Gejala yang ditimbulkan tergantung tingkat serangan, yaitu kronis dan akut. 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)

Secara umum, mekanisme penginfeksi bakteri terhadap inangnya yaitu dengan cara melakukan perlekatan (anchoring) dengan sel tubuh inang dan mampu masuk ke sel inang. Salah satu cara bakteri masuk ke sel inang yaitu dengan melubangi membran sel menggunakan enzim. Setelah itu bakteri akan memulai replikasi materi genetik dan selubung protein, kemudian bakteri akan memanfaatkan organel-organel sel dan mengakibatkan sel mengalami lisis. Proses-proses pada siklus lisogenik yaitu reduksi dari siklus litik ke profage (dimana materi genetik bakteri dan sel inang bergabung), bakteri mengalami pembelahan biner dan profage keluar dari kromosom bakteri (Anonymous, 2010<sup>a</sup>).

### **2.3 Antagonisme Antar Bakteri**

Dalam suatu lingkungan yang kompleks yang berisi berbagai macam organisme, aktivitas metabolisme suatu organisme akan berpengaruh terhadap lingkungannya. Mikroorganisme yang berada dalam lingkungan yang kompleks senantiasa berhubungan baik dengan faktor biotik dan faktor abiotik. Hubungan mikroorganisme dapat terjadi baik dengan sesama mikroorganisme, hewan ataupun dengan tumbuhan. Hubungan ini membentuk suatu pola interaksi yang spesifik yang dikenal dengan simbiosis (Kusnadi, 2003).

Interaksi antar mikroorganisme yang menempati suatu habitat yang sama akan memberikan beberapa pengaruh bagi mikroorganisme itu sendiri. Adapun pengaruh yang ditimbulkan yaitu berupa pengaruh positif (saling menguntungkan), pengaruh negatif (saling merugikan) dan netral (tidak ada pengaruh yang berarti). Ada beberapa macam hubungan antar spesies bakteri di alam, antara lain ialah

komensalisme, mutualisme serta antagonisme. Komensalisme merupakan suatu interaksi antara mikroorganisme dengan organisme lain dimana satu jenis dapat diuntungkan namun jenis lain tidak dirugikan. Sedangkan interaksi antar mikroorganisme yang dapat saling menguntungkan disebut dengan simbiosis mutualisme dan hubungan mikroorganisme yang dengan organisme lain yang saling menekan pertumbuhannya disebut dengan antagonisme (Kusnadi, 2003).

Bentuk interaksi ini merupakan hubungan asosial. Biasanya spesies yang satu menghasilkan suatu senyawa kimia yang dapat meracuni spesies lain yang menyebabkan pertumbuhan spesies lainnya terganggu. Senyawa kimia yang dihasilkan dapat berupa sekret atau metabolit sekunder. Biasanya bentuk interaksi ini muncul karena ada beberapa jenis mikroorganisme yang menempati ruang dan waktu yang sama, sehingga mikroorganisme tersebut harus memperebutkan nutrisi untuk tetap dapat tumbuh dan berkembangbiak. Akhirnya dari interaksi semacam ini memberikan efek beberapa mikroorganisme tumbuh dengan optimal sementara organisme yang lainnya tertekan pertumbuhannya (Kusnadi, 2003).

Antagonisme dapat terjadi antara mikroba yang bersifat menguntungkan dan mikroba yang bersifat pathogen. Mikroba antagonis merupakan suatu jasad renik yang dapat menekan, menghambat dan memusnahkan mikroba lainnya. Mikroba antagonis ini dapat berupa bakteri, jamur atau cendawan. Mikroba yang bermanfaat juga termasuk mikroba antagonis yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber bahan aktif biopestisida untuk pengendalian hama dan penyakit tanaman (Anonymous, 2010<sup>b</sup>).

Dalam suatu lingkungan yang kompleks yang berisi berbagai macam organisme. Aktivitas metabolisme suatu organisme akan berpengaruh terhadap lingkungannya. Mikroorganisme seperti halnya organisme lain yang berada dalam lingkungan yang kompleks senantiasa berhubungan baik dengan pengaruh faktor biotik dan faktor abiotik. Sedikit sekali suatu mikroorganisme yang hidup di alam

mampu hidup secara individual. Hubungan mikroorganisme dapat terjadi baik dengan sesama mikroorganisme, hewan ataupun dengan tumbuhan. Hubungan ini membentuk suatu pola interaksi yang spesifik yang dikenal dengan simbiosis (Kusnadi, 2003)

Hubungan mikroorganisme dengan organisme lain yang saling menekan pertumbuhannya disebut antagonisme. Bentuk interaksi ini merupakan hubungan asosial. Biasanya spesies yang satu menghasilkan suatu senyawa kimia yang dapat meracuni spesies lain yang menyebabkan pertumbuhan spesies lainnya terganggu. Senyawa kimia yang dihasilkan dapat berupa sekret atau metabolit sekunder. Bentuk lain dari interaksi antagonisme di alam dapat berupa kompetisi, parasitisme, amensalisme dan predasi. Biasanya bentuk interaksi ini muncul karena ada beberapa jenis mikroorganisme yang menempati ruang dan waktu yang sama, sehingga mereka harus memperebutkan nutrisi untuk tetap dapat tumbuh dan berkembangbiak.

Akhirnya dari interaksi semacam ini memberikan efek beberapa mikroorganisme tumbuh dengan optimal sementara organisme yang lainnya tertekan pertumbuhannya (Kusnadi, 2003). Lebih lanjut dinyatakan jumlah populasi mikroorganisme dalam suatu komunitas agar dapat mencapai jumlah yang optimal, maka mikroorganisme berinteraksi dan mempengaruhi organisme yang lainnya. Mikroorganisme harus berkompetisi dengan organisme lain dalam memperoleh nutrisi dari lingkungannya sehingga dapat terus hidup dan dapat berkembangbiak dengan sukses.

## **2.4 Uji Efektifitas Anti mikroba secara In vitro**

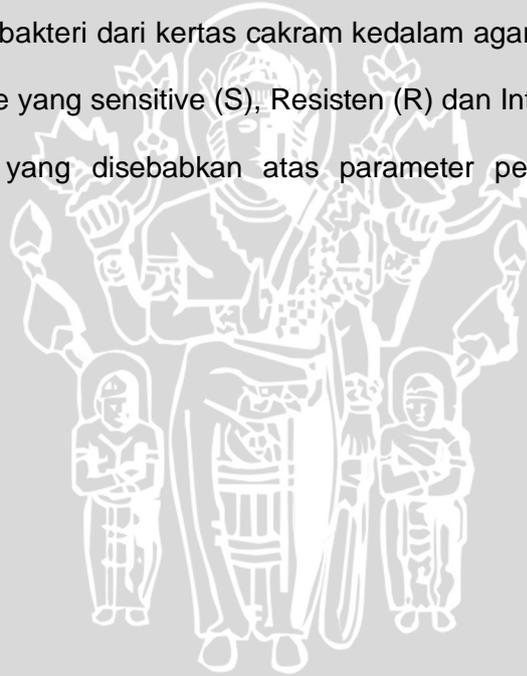
### **2.4.1 Cara Cakram**

Menurut Lay (1994), bahan antibakteri bersifat menghambat bila digunakan dalam konsentrasi kecil. Namun bila dalam konsentrasi tinggi dapat mematikan. Salah satu cara untuk menguji bahan antibakteri dapat dilakukan dengan uji

cakram. Uji antibakteri dengan cara cakram adalah untuk mengetahui pada konsentrasi berapa persen yang bersifat bakteristatik maupun bakterisidal.

Pada uji cakram lempengan agar disemai dengan mikroorganisme yang diuji. Cakram yang berisi antibakteri diletakkan diatas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antibakteri terlihat sebagai wilayah jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme (Lay, 1994). Lebar diameter daerah hambatan ini tergantung pada daya serap obat ke dalam agar dan kepekatan bakteri terhadap obat tersebut.

Cara cakram menghasilkan kategori sensitifitas terhadap antibakteri berdasarkan difusi antibakteri dari kertas cakram kedalam agar. Nilainya dilaporkan dalam istilah organisme yang sensitive (S), Resisten (R) dan Intermediate atau tidak dapat ditentukan (I), yang disebabkan atas parameter penghambatan bakteri (Edberg, 1986).



### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Peralatan Penelitian

Timbangan digital, petri disk, erlenmeyer, jarum ose, inkubator, autoclaf, lemari pendingin, mikropipet, beaker glass, falcon, pemanas air, power supply, plastik, alat tulis, bunsen, mikroskop, blue tip, yellow tip, white tip, eppendorf.

##### 3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: Bakteri *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar*), BHIB (*Brain Hearth Infusion Broth*), PBS (*phosphate buffer saline*), EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetate*), Aquadest, Pewarna gram, TSA (*Tryptic Soy Agar*).

#### 3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

##### 3.2.1 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Pada dasarnya tujuan eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat serta seberapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberi perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimen dan menyediakan kontrol perbandingan. Teknik pengumpulan data dilakukan dengan observasi langsung atas pengamatan langsung (Nazir, 1988).

Pembacaan efektifitas bakterin *V. alginolyticus* terhadap pertumbuhan bakterin *V. harveyi* secara *in vitro* dengan mengukur daerah hambat sekitar kertas cakram yang memperlihatkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.

##### 3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) setiap perlakuan dilakukan sebagai satuan tersendiri, tidak ada hubungan pengelompokan. Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu rancangan yang digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam

atau homogen, sehingga banyak digunakan untuk percobaan di laboratorium (Gasperz, 1991).

Menurut Gasperz (1991), model umum untuk RAL adalah sebagai berikut:

$$Y = \mu + T + \alpha$$

Keterangan :

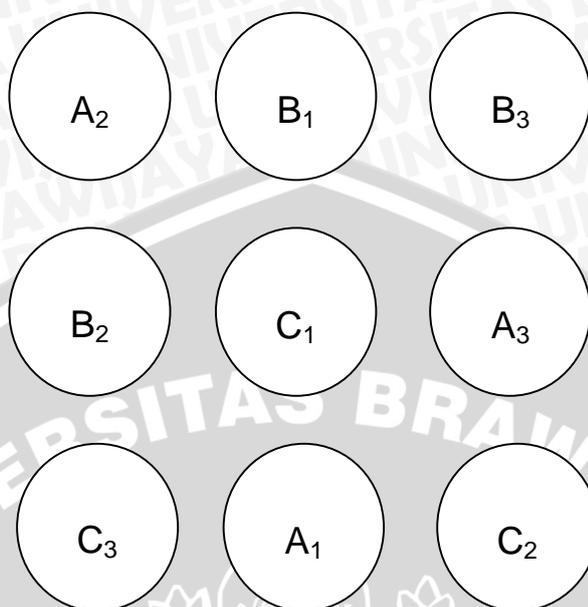
- Y = Nilai pengamatan dari suatu percobaan  
 $\mu$  = nilai tengah populasi (rata-rata sesungguhnya)  
T = Pengaruh perlakuan  
 $\alpha$  = Pengaruh galat dari suatu percobaan

Penelitian ini terdiri dari 3 perlakuan, dengan 3 kali ulangan. Sebagai perlakuan adalah pemberian bakterin *V. alginolyticus* dengan konsentrasi yang berbeda. Berdasarkan penelitian pendahuluan diketahui bahwa dosis bakterin *V. alginolyticus* yang mulai berpengaruh terhadap pertumbuhan *V. harveyi* adalah dosis 50%. Oleh karena itu range perlakuan yang digunakan : A adalah pemberian bakterin *V. alginolyticus* dengan dosis 0 %, B adalah pemberian bakterin *V. alginolyticus* dengan dosis 50 %, C adalah pemberian bakterin *V. alginolyticus* dengan dosis 100 %

Adapun perlakuan tersebut adalah sebagai berikut :

- A = Pemberian bakterin *V. alginolyticus* konsentrasi 0%
- B = Pemberian bakterin *V. alginolyticus* konsentrasi 50%
- C = Pemberian bakterin *V. alginolyticus* konsentrasi 100%

Penempatan perlakuan dilakukan secara acak seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Penempatan Perlakuan Acak

Keterangan gambar:

A, B, C = Perlakuan konsentrasi yang Berbeda  
1, 2, 3 = Ulangan

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Persiapan Alat

##### A. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi adalah suatu proses baik fisika, kimia dan mekanik yang membunuh semua bentuk hidup terutama mikkroorganisme yang mengganggu atau merusak media dan proses yang sedang dikerjakan. Pemilihan cara sterilisasi tergantung pada macam bahan dan alat yang disterilkan, ketahanan terhadap panas, dan bentuk bahan yang disterilkan yaitu padat, cair atau berbentuk gas (Waluyo, 2008).

Alat dan bahan yang akan disterilkan dibungkus dengan menggunakan kertas perkamen atau kertas koran, kemudian diikat dengan menggunakan benang. Air secukupnya dituang ke dalam autoklaf. Kemudian alat dan bahan yang sudah dibungkus kertas perkamen dimasukkan ke dalam autoklaf dan ditutup rapat

dengan mengencangkan baut secara silang. Kompor pemanas dinyalakan, setelah beberapa saat monometer akan menunjukkan angka 1 atm, jika terjadi kelebihan tekanan kran udara dibuka hingga manometer menunjukkan angka 1 atm kembali. Keadaan tekanan uap jenuh dapat terjadi berulang kali sampai suhu 121°C dan manometer menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit. Kompor dimatikan dan kran dibuka untuk mengurangi tekanan. Tunggu beberapa saat sampai termometer dan manometer menunjukkan angka 0 (nol) lalu buka penutup autoklaf secara silang. Alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil. Alat yang telah disterilkan disimpan dalam inkubator, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin (Dwijoseputro, 1989).

## **B. Pembuatan Media**

### **a) Media BHIB (Brain Heart Infusion Broth)**

Media BHIB ditimbang sebanyak 18,5 gram dan dilarutkan dengan 500 ml aquades dalam erlenmeyer. Media diaduk hingga larut sempurna dan dimasukkan ke dalam botol sebanyak 500 ml. Kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>o</sup> C selama 15 menit (Cappuccino and Sherman, 1998).

### **b) Media TCBSA (Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose Agar)**

Media TCBS yang digunakan dari OXOID ditimbang sebanyak 35,2 gram dan dicampurkan dengan NaCl sebanyak 8,0 gram. Kedua bahan tersebut dilarutkan dengan 500 ml aquades dalam erlenmeyer. Media dipanaskan selama 30 menit sambil sesekali diaduk dan digoyang untuk membantu pelarutan supaya homogen. Setelah itu, media didiamkan sejenak sampai tidak terlalu panas dan media dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 15-25 ml secara aseptik (Cappuccino and Sherman, 1998).

### **c) Media PBS (Phospat Buffer Saline)**

Bahan-bahan untuk membuat larutan PBS ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,2 gr;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,6 gr;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,35 gr; KCl 3,4 gr) ditimbang dan dilarutkan dengan 500 ml aquades dalam erlenmeyer. Kemudian diaduk dengan stirer sampai larut lalu pH

disesuaikan sampai pH 7,4. Setelah pH sesuai baru ditambah aquades sampai 500 ml. Selanjutnya larutan PBS dimasukkan ke dalam botol ukuran 500 ml dan disterilisasi. Larutan yang telah disterilkan disimpan pada suhu 4°C (Cappuccino and Sherman, 1998).

### 3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

#### A. Pembuatan Biakan Bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi*

Cawan yang berisi media TCBSA yang telah disterilkan disiapkan terlebih dahulu. Kemudian isolat bakteri yang diambil dari biakan murni *V. alginolyticus* dan *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°C selama 24 jam (Cappuccino and Sherman, 1998).

#### B. 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 :

Dibuat sediaan diatas kaca obyek, dikeringkan pada suhu kamar, jika sudah kering difiksasi dengan cara dipanaskan diatas nyala api 3-4 kali lalu dibiarkan dingin. Setelah dingin diletakan diatas rak pewarnaan. Dituangkan larutan kristal violet diatas sediaan, diamkan selama 1 menit. Sediaan dibilas dengan air, kemudian dituangi larutan Lugol diamkan 1 menit dan bilas dengan air. Sediaan di lunturkan dengan Alkohol 96% hingga warna violet memudar dan bilas dengan air. Kemudian sediaan dituangi larutan safranin diamkan 30 detik, dibilas dengan air, dikeringudarkan. Setelah sediaan kering dilakukan pengamatan dibawah mikroskop perbesaran 100x dan menggunakan minyak emersi.

### C. Perbanyak Bakteri *V. alginolyticus*

Hasil biakan *V. alginolyticus* dalam media padat (TCBSA), diambil dengan kerokan yang sebelumnya dituangkan PBS steril pH 7,4 secukupnya (5 ose). Suspensi bakteri dimasukkan dalam botol yang berisi 1000 ml larutan *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), Kemudian digoyang kuat selama 30 menit pada penangas suhu 37°C. Kemudian suspensi bakteri sebanyak 10 ml dimasukkan dalam setiap botol. Selanjutnya dilakukan pengeraman suhu 37°C selama 2 X 24 jam di dalam water bath (Cappuccino and Sherman, 1998).

### D. Pembuatan Bakterin

Bakterin dibuat dengan cara mematikan *V. alginolyticus* dengan cara dipanaskan pada suhu 100 °C selama 10 menit, Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Dipisahkan antara supernatan dan pelet. Diambil pelet tersebut dan diletakkan dalam lemari pendingin (Joly *et al.*, 1990)

### E. Pembuatan Konsentrasi Bakterin

Konsentrasi bakterin untuk perlakuan dibuat apabila pada konsentrasi 0% hanya menggunakan aquades murni. Pada konsentrasi 50% didapat dari pengenceran antara bakterin 1 ml ditambahkan dengan 1 ml aquades (1:1), sedangkan pada konsentrasi 100% hanya menggunakan bakterin tanpa aquades.

### F. Uji Tantang Bakterin dari *V. alginolyticus* Terhadap Pertumbuhan *V. harveyi*

Menurut Pelczar dan Chan (1986), salah satu cara untuk menguji antimikrobal dapat dilakukan dengan uji cakram. Pada prinsipnya uji ini adalah mengukur daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bakterin *V. alginolyticus* dengan *V. harveyi* yang dipanen. Prosedur difusi kertas cakram agar yang distandardisasikan (metode Kirby-Bauer) merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibiotik untuk bakteri. Sensitivitas suatu

bakteri terhadap antibiotik ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Semakin besar diameternya maka semakin terhambat pertumbuhannya.

Cara kerja pengujian antibiotik dengan metode Kirby-Bauer :

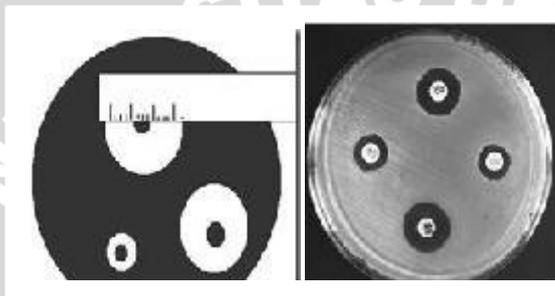
Stok murni *V. harveyi* yang diisolasi, diambil dan ditanam dalam media TCBSA pada suhu 30°C selama 2 x 24 jam. Diambil 5 koloni murni *V. harveyi* dimasukkan kedalam medium BHIB 10 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Koloni murni bakteri *V. harveyi* diambil dengan pipet 1 ml dimasukkan kedalam 4 ml NaCl Fisiologis 0.9%. Kemudian menentukan kekeruhan atau kepadatan bakteri dan dicocokkan dengan Standart Mc Farland 1 sel/ml. Kapas Lidi (cotton swab) steril dicelupkan dalam tabung suspensi biakan *V. harveyi*, dengan kepadatan Standart Mc Farland I sel/ml ( $3 \times 10^8$  sel/ml), kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung (diperas) agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut. Bakteri *V. harveyi* disebar pada seluruh permukaan lempeng agar TCBSA dengan cara dioleskan. Untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar, kemudian lempeng agar diputar 90° dan dibuat olesan kedua, dengan lempeng agar diputar 45° dan dibuat olesan ketiga. Lempeng agar dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit.

Kemudian kertas cakram yang sudah direndam dengan bakterin *V. alginolyticus* diambil dengan pinset dan ditempatkan pada permukaan lempeng agar yang telah disemai dengan bakteri *V. harveyi*. Dalam 1 lempeng agar dapat digunakan 5-6 cakram dosis perlakuan, jarak antara kertas cakram harus cukup luas, sehingga wilayah jernih tidak saling berhimpitan yang nantinya akan menyulitkan dalam proses pengukuran zona hambat. Kertas cakram ditekan dengan pinset, tidak perlu terlalu keras karena akan merusak permukaan agar. Lempeng yang sudah ditempelkan kertas cakram diinkubasi pada suhu kamar, selama 24 – 48 jam dari bakteri patogen yang sedang diujikan. Setelah bakteri uji sudah tumbuh merata, dan terlihat adanya zona jernih dipermukaan agar, maka luas zona jernih

dapat diukur dengan menggunakan jangka sorong guna mengetahui diameter zona hambatnya.

### 3.4 Parameter Penelitian

Parameter uji yaitu menggunakan parameter kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari pengukuran daerah hambatan bakterin *V. alginolyticus* terhadap pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Pengukuran zona hambat dilakukan dengan mengukur diameter daerah yang jernih atau tidak ada pertumbuhan (Pradhika, 2008). Cara pengukuran zona hambat tersebut dapat dilihat pada gambar berikut:



**Gambar 2. Cara pengukuran zona hambat dengan metode kertas cakram (www. Saurus.blogspot.com)**

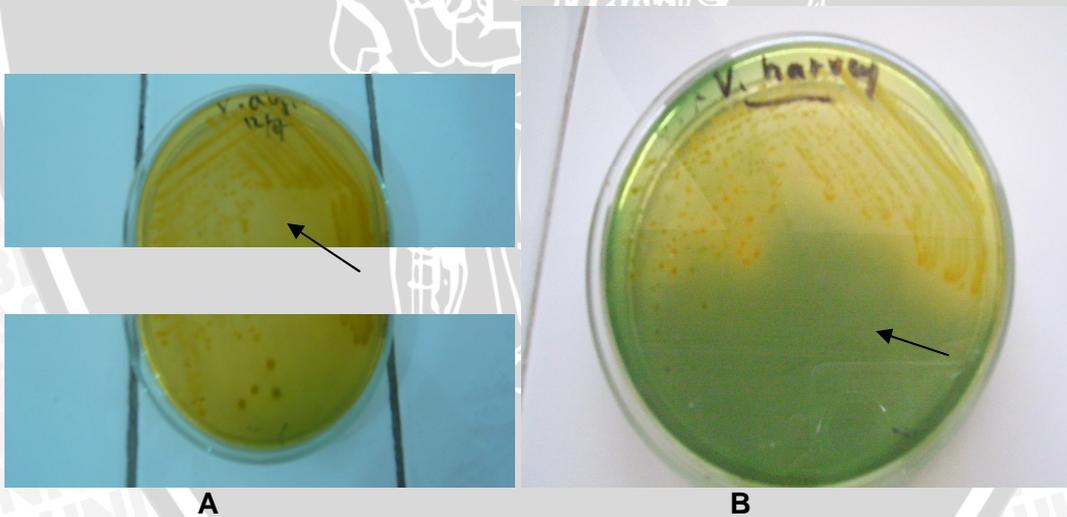
### 3.5 Analisa Data

Analisa data hasil penelitian dilakukan secara statistik dengan menggunakan analisa keragaman sesuai dengan rancangan yang digunakan, yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Uji keragaman untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan dosis terhadap diameter daerah hambat. Jika dari analisa sidik ragam diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata (*significant*) atau berbeda sangat nyata (*highly significant*), maka untuk membandingkan nilai dilanjutkan dengan uji Berbeda Nyata Terkecil (BNT).

#### 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

##### 4.1 Kultur Bakteri *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio harveyi*

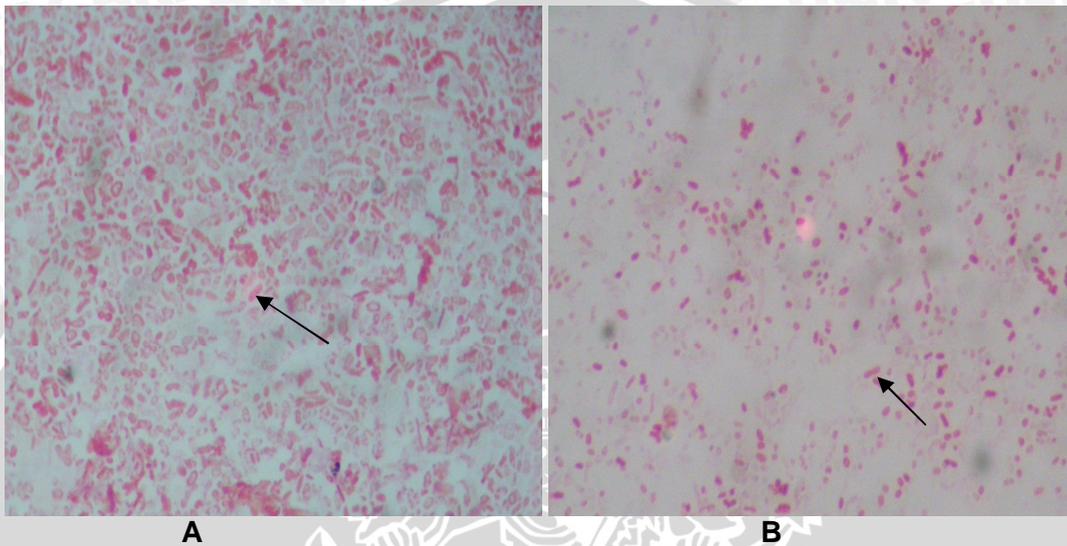
Isolat murni bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi* di peroleh dari Balai Besar Air Payau (BBAP) Situbondo. Kemudian kultur murni bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi* dibiakkan pada media TCBSA (*Thiosulfat Citrate Bisesalt Sucrose Agar*) dan diinkubasi pada suhu ruang 27°C selama 24 jam. Isolat bakteri *V. alginolyticus* diperbanyak dalam media cair BHIB (*Brain Heart Infusion*). Berdasarkan hasil percobaan Nakanashi (1963) dalam Acumedia (2004) semua golongan bakteri *Vibrio* sp. akan tumbuh di media TCBSA, kecuali *Vibrio hollisae*. Hal ini dikarenakan media TCBSA memiliki nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri *Vibrio* sp. untuk tumbuh. Bakteri *V. alginolyticus* yang tumbuh pada media TCBSA berwarna kuning terang sedangkan untuk *V. harveyi* berwarna agak kecoklatan. Hasil kultur isolat bakteri diperoleh koloni pada media TCBSA bersifat menyebar dan berwarna kuning (Gambar 3).



**Gambar 3. Kultur bakteri *V. alginolyticus* (A) dan *V. harveyi* (B) pada media TCBSA. Tanda Panah menunjukkan Koloni Bakteri**

Untuk mendapatkan deskripsi bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi* dilakukan uji bakteri melalui pewarnaan gram dan berdasarkan pengamatan menggunakan mikroskop Olympus dengan pembesaran 1000x, hasil perwarnaan

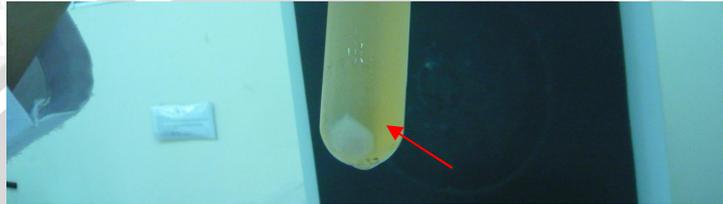
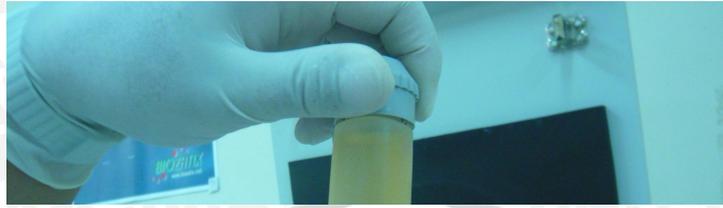
tersebut menunjukkan bahwa bakteri *V. alginolyticus* dan *V. harveyi* adalah bakteri gram negatif (berwarna merah), morfologi bakteri berbentuk batang bengkok (Gambar 4). Hal ini sesuai dengan pendapat Hjeltnest dan Roberts (2001), bahwa genus *Vibrio* bersifat gram negatif, berbentuk batang lurus atau bengkok (kurva). Bentuk koloni halus, bulat cembung berwarna krem.



**Gambar 4. Hasil pewarnaan *V. alginolyticus* (A) dan *V. harveyi* (B). Tanda Panah menunjukkan Morfologi Berbentuk Batang**

#### **4.2 Hasil Pembuatan Bakterin *V. alginolyticus***

Isolat bakterin dari bakteri *V. alginolyticus* dengan kepadatan  $10^8$  sel/ml dibuat dengan cara mematikan *V. alginolyticus* dengan dipanaskan pada suhu  $100^\circ\text{C}$  selama 20 menit, Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Kemudian dipisahkan antara supernatan dan pelet. Diambil pelet tersebut dan diletakkan dalam lemari pendingin. Hasil pellet itu adalah bakterin yang akan digunakan untuk ujiantang dengan bakteri *V. harveyi* (Gambar 5).



**Gambar 5.** Hasil proses sentrifuge. Tanda Panah merah menunjukkan pellet atau bakterin hasil pemanasan dan sentrifuge.

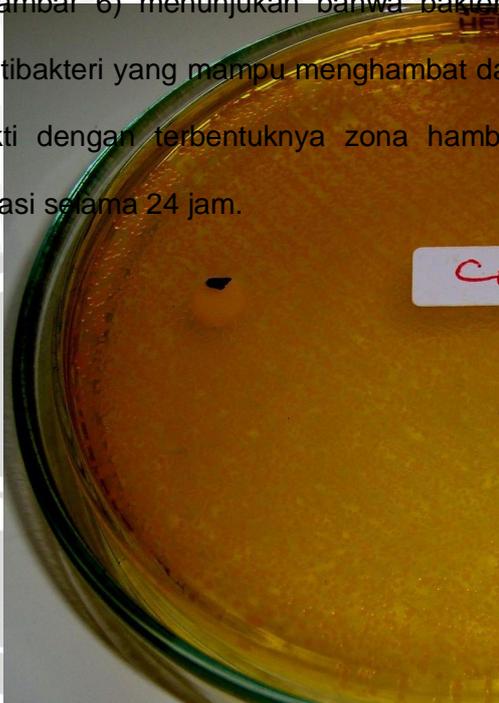
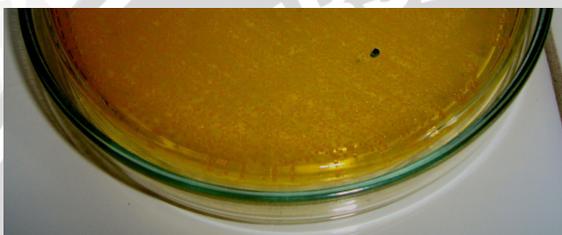
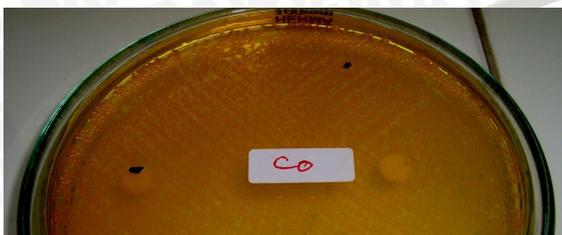
#### 4.3 Penentuan Konsentrasi Bakterin untuk Uji Tantang

Penentuan konsentrasi Bakterin yang digunakan untuk uji tantang didapatkan dari penelitian pendahuluan. Pada penelitian pendahuluan digunakan beberapa konsentrasi bakterin yang diuji, yaitu 0% (kontrol), 25%, 50%, dan 100%. Konsentrasi 50% memberikan zona hambat yang sangat kecil, sedangkan konsentrasi 25% tidak memberikan zona hambat (sama dengan kontrol). Oleh karena itu, pada penelitian ini, konsentrasi yang digunakan yaitu 0% (Kontrol), 50%, dan 100%. Sedangkan kepadatan bakteri uji yaitu *V. harveyi* yang digunakan yaitu  $10^8$  sel/ml.

#### 4.4 Uji Tantang dengan Kertas Cakram

Dalam penelitian ini metode yang digunakan untuk uji tantang adalah metode difusi dengan menggunakan kertas cakram. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya daerah hambat disekeliling kertas cakram, sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan tidak terdapatnya zona hambat disekeliling kertas cakram. Kepadatan bakteri uji yang digunakan adalah  $10^8$  sel/ml.

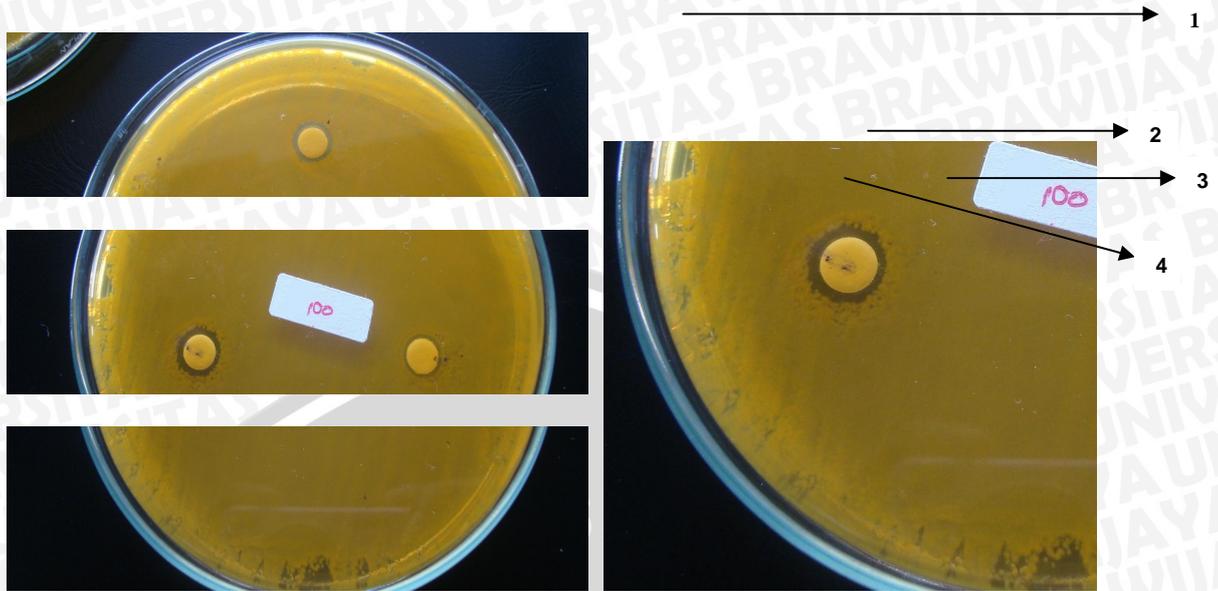
Hasil pengamatan ujiantang (Gambar 6) menunjukkan bahwa bakterin *V. alginolyticus* memiliki potensi aktivitas antibakteri yang mampu menghambat dan mematikan sel bakteri *V. harveyi*, terbukti dengan terbentuknya zona hambat disekitar kertas cakram, setelah masa inkubasi selama 24 jam.



A  
Hasil Uji Tantang k



B  
Hasil Uji Tantang konsentrasi 50%



C

### Hasil Uji Tantang konsentrasi 100%

**Gambar 6. Hasil Uji Tantang Bakterin *V. alginolyticus* terhadap *V. Harveyi* Ket :**

- 1: Media TCBSA;**
- 2: Daerah bening;**
- 3: Daerah yang ditumbuhi bakteri *V. harveyi***
- 4: Kertas Cakram mengandung Bakterin *V. alginolyticus*;**

Gambar A menunjukkan bahwa bakterin *V. alginolyticus* memiliki potensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dengan terbentuknya daerah bening yang memiliki ukuran sangat kecil sekali di sekitar kertas cakram begitu pula pada Gambar B. Gambar C menunjukkan bahwa bakterin *V. alginolyticus* memiliki potensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Hal ini diduga bahwa pada bakterin *V. alginolyticus* terdapat suatu zat antibakteri yang dapat mengganggu pertumbuhan *V. harveyi* dengan terbentuknya daerah bening disekitar kertas cakram sesuai dosis perlakuan. Zat antibakteri adalah senyawa yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Pradhika,2008).

Ukuran daerah bening yang terbentuk merupakan ukuran kekuatan zat antibakteri tersebut dalam menghambat bakteri uji. Sesuai dengan pendapat Jawetz *et al* (1984) bahwa diameter daerah hambat jernih yang terbentuk dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan suatu zat terhadap bakteri yang diuji. Diameter kertas

cakram yang digunakan yaitu sebesar 6 mm. Hubungan antara konsentrasi bakterin *V. alginolyticus* dengan diameter daerah hambat yang terbentuk dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Hasil Pengukuran Zona Daerah Hambat (mm)**

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (0 %)	6,0	6,0	6,0	18,0	6,0
B (50 %)	6,0	7,0	8,0	21,0	7,0
C (100 %)	9,0	9,0	10,0	28,0	9,3
Total				67,0	

Tabel 1 menunjukkan bahwa rata-rata zona daerah hambat untuk masing-masing perlakuan berbeda. Rata-rata zona hambat yang terbentuk pada perlakuan A (0%) sebesar 6,0 mm atau tidak terbentuk zona daerah hambat karena kontrol yang digunakan hanya menggunakan aquades murni, sehingga tidak mempengaruhi pertumbuhan *V. harveyi*. Perlakuan B (50%) sebesar 7,0 mm dan perlakuan C (100%) sebesar 9,3 mm. Dari hasil tersebut diketahui bahwa rata-rata zona daerah hambat yang terbentuk sangat kecil. Hal ini mungkin disebabkan karena bakterin *V. alginolyticus* merupakan bahan dalam bentuk suspensi akibatnya proses penyerapan oleh kertas cakram kurang optimal sehingga mempengaruhi besarnya zona daerah hambat yang terbentuk pada media TCBSA.

Bakterin *V. alginolyticus* dengan konsentrasi 100 % memberikan zona daerah hambat yang tinggi terhadap daya hambat *V. harveyi*. Daerah hambat yang tinggi terjadi karena semakin tinggi konsentrasi bakterin *V. alginolyticus*, maka semakin banyak zat antibakteri tersebut. Zat antibakteri dapat bersifat membunuh

mikroorganisme (*microbicidal*) atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme (*microbiostatik*) (Pradhika,2008).

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).

Untuk mengetahui besarnya pengaruh konsentrasi bakterin *V. alginolyticus* terhadap zona daerah hambat yang terbentuk maka dilakukan analisa sidik ragam. Hasil analisa sidik ragam konsentrasi bakterin *V. alginolyticus* terhadap zona daerah hambat seperti terlihat pada Tabel 2.

**Tabel 2. Hasil Analisa Sidik Ragam Zona Daerah hambat**

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	17,63	8,815	19,808**	5,14	10,92
Acak	6	2,67	0,445			
Total	8	20,3				

Ket: \*\* Berbeda sangat nyata

Tabel 2 menunjukan bahwa nilai signifikansi F hitung lebih besar dari F1% sehingga dapat dikatakan bahwa perlakuan pemberian bakterin *V. alginolyticus* yang berbeda berpengaruh sangat nyata terhadap besarnya zona daerah hambat yang terbentuk. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi zat antibakteri sangat berpengaruh terhadap besarnya zona daerah hambat yang terbentuk. Sesuai dengan pendapat Pelczar dan Chan (2009), bahwa semakin tinggi konsentrasi suatu bahan antibakteri maka aktivitas antibakterinya semakin kuat pula.

Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan, digunakan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan nilai BNT 5% dan BNT 1%. Hasil perhitungan uji BNT perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Hasil Uji BNT Zona Daerah Hambat**

Rata2 Perlakuan	A = 6,0	B = 7,0	C = 9,3	Notasi
A = 6,0	-	-	-	a
B = 7,0	1,0 <sup>ns</sup>	-	-	a
C = 9,3	3,3 **	2,3**	-	b

Keterangan: Notasi sama berarti tidak berbeda

Ns: tidak berbeda nyata

\*\* : berbeda sangat nyata

Tabel 3 menunjukkan bahwa perlakuan C (100%) memberikan hasil yang berbeda sangat nyata terhadap perlakuan B (50%) dan perlakuan A (0%), sedangkan perlakuan A (0%) dan perlakuan B (50%) tidak berbeda nyata. Pernyataan ini menunjukkan semakin tinggi konsentrasi bakterin *V. alginolyticus* yang diberikan, maka zona daerah hambat yang terbentuk semakin besar atau sebaliknya semakin kecil konsentrasi bakterin *V. alginolyticus* yang diberikan, maka zona daerah hambat yang terbentuk semakin kecil.

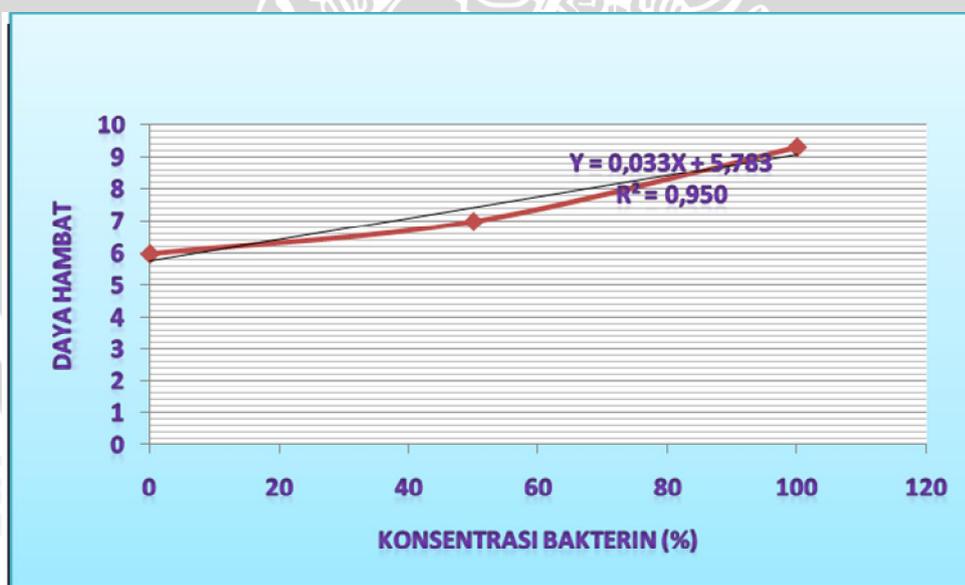
Dalam penelitian mikrobiologi, bahan antibakteri yang diujikan biasanya digunakan dalam bentuk konsentrasi sehingga menyebabkan zat antibakteri yang terkandung dalam suatu bahan tiap perlakuan berbeda-beda. Ada yang tinggi juga ada yang rendah. Akan tetapi tinggi rendahnya kandungan zat antibakteri dalam 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).

Hubungan antara konsentrasi bakterin *V. alginolyticus* terhadap diameter daerah hambat yang terbentuk, dapat diketahui melalui analisa polinomial orthogonal. Hasil perhitungan model regresi dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Analisa Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F5%	F1%
Perlakuan	2	17,63	8,815			
- Linear	1	16,67	16,67	37,460 **	5,99	13,75
- Kuadratik	1	0,88	0,88	1,977 *	5,99	13,75
Acak	6	2,67	0,445			
Total	8	20,3				

Tabel 4 menunjukkan bahwa nilai regresi linear lebih besar dari regresi kuadratik, sehingga model regresi linier lebih sesuai digunakan sebagai penduga hubungan pemberian bakterin *V. alginolyticus* dengan konsentrasi yang berbeda terhadap zona daerah hambat (Gambar 7).



Gambar 7. Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Bakterin *V. alginolyticus* dengan Daerah Hambat.

Hasil perhitungan konsentrasi bakterin *V. alginolyticus* terhadap zona daerah hambat dengan analisa regresi menunjukkan bahwa nilai regresi  $R^2 = 0,950$  dengan persamaan  $y = 0,033x + 5,783$ . Berdasarkan hasil analisa tersebut tampak bahwa besarnya zona daerah hambat yang terbentuk dipengaruhi oleh konsentrasi

bakterin *V. alginolyticus* dan sisanya dipengaruhi oleh variabel lain. Hal ini menunjukkan bahwa antara konsentrasi bakterin *V. alginolyticus* dengan zona daerah hambat yang terbentuk memiliki hubungan yang erat dengan nilai korelasi ( $r$ ) sebesar 0,92.

Gambar 7 diatas menunjukkan bahwa semakin besar pemberian konsentrasi bakterin *V. alginolyticus* maka zona daerah hambat yang terbentuk semakin besar. Grafik tersebut terlihat linier yang artinya zona daerah hambat semakin meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi bakterin *V. alginolyticus*.

Rerata zona daerah hambat yang paling tinggi terdapat pada konsentrasi 100% bakterin *V. alginolyticus* jika dibandingkan dengan konsentrasi 50% dan 0%. Hasil ini memberi bukti bahwa semakin besar konsentrasi bakterin *V. alginolyticus* maka semakin banyak zat antibakteri yang dikandung dan berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri uji, sehingga zona daerah hambat yang akan terbentuk juga semakin besar. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa bakterin *V. alginolyticus* memiliki potensi atau kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *V. harveyi*.

## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

Bakterin *V. alginolyticus* memiliki potensi antagonistik terhadap *V.harveyi* karena mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* dengan terbentuknya daerah bening disekeliling kertas cakram.

Konsentrasi Bakterin *V. alginolyticus* yang mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi* adalah konsentrasi 100% dengan rata-rata diameter daerah hambat 9,3 mm.

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh bahwa bakterin *V. alginolyticus* mampu menghambat pertumbuhan *V. harveyi*, maka di sarankan perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang bakterin *V. alginolyticus* sebagai salah satu bahan imunostimulan dalam upaya pencegahan penyakit bakteri *V. alginolyticus* secara *in vivo*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2010a. **Mekanisme Infeksi Bakteri**. <http://library.usu.ac.id/download/>  
Diakses tanggal 25 Maret 2010.
- \_\_\_\_\_. 2010b. **Mikroba Antagonis Sebagai Agen Hayati Pengendali Penyakit Tanaman** <http://www.segunung/> @indoway.net. Diakses pada tanggal 25 Agustus 2010.
- \_\_\_\_\_. 2010c. **Vibrio sp.** <http://www.pustaka-deptan.go.id/>. Diakses tanggal 18 Mei 2010.
- Acumedia. 2004. **TCBS AGAR**. <http://www.neogen.com/Acumedia/pdf>. Diakses tanggal 13 februari 2010
- Agun. 2008. **Daya Antimikroba Berbagai Konsentrasi Yogurt terhadap Bakteri Salmonella typhi secara In vitro**. <http://one.indoskripsi.com>. Diakses tanggal 14 Agustus 2010
- Afrianto E. dan E. Liviawaty. 1992. **Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan**. Kanisius. Yogyakarta. 89 hal.
- Brongden K.A, J.A Roth, T.B. Stanton, C.A. Bolin, F.C. Minion and M.J. Wannemuehler, 2000. **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogen**. American Society for Microbiology. ASM Press. Washington DC. 846 hal.
- Brooks, G. F., J. S. Butel dan S. A. Morse. 2001. **Mikrobiologi Kedokteran**. Penerjemah: Eddy, M., Kuntamai, Eddy Bagus, W. Ni Made, M., Setio, Lidawati. A Salemba Medika. Jakarta 528 hal
- Cappuccino, J.G and N. Sherman. 1998. **Microbiology a Laboratory Manual**. Fifth Edition. Rockland community college. Suffern, New York. 477 hal.
- Dwidjoseputro, D. 1989. **Dasar-dasar Mikrobiologi**. Penerbit Djambatan. 206 hal
- Denkin S. M., P. Sekaric and D.R. Nelson. 2004. **Gel Shift Analysis of the *empA* Promoter Region in *Vibrio Alginolyticus***. Department of Cell and Molecular Biology, University of Rhodes Island, Kingston, RI 02881 USA. 676 hal.
- Edberg, S. C., 1986. **Tes Kerentanan Mikroba dalam Antibiotik dan Infeksi**. Alih Bahasa: Chandra Sanusi CV EGC. Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta. 219 Hal
- Feliatra, 1999. **Identifikasi Bakteri Pathogen (*Vibrio sp*) di Perairan Nongso Batam Propinsi Riau**. Jurnal Natur Indonesia Volume II. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau. Hal 28–33. [http://www.unri.ac.id/jurnal/jurnal\\_natur/vol2/5.pdf](http://www.unri.ac.id/jurnal/jurnal_natur/vol2/5.pdf). diakses tanggal 19 januari 2010
- Firdiansyah, 2007. **Pengaruh Pemberian Alkaloid Ubur-Ubur (*Bougainvillia sp.*) Melalui Pakan Terhadap Perubahan Histopatologi Hati dan Ginjal**

**Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang Terinfeksi Bakteri *Vibrio harveyi*.** Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang. (Tidak Dipublikasi).

Gasperz, V. 1991. **Metode Perancangan Percobaan**. Amirco. Bandung.

Haliman, R. W. dan D. Adiwijaya. S. 2005. **Udang Vannamei**. Penebar Swadaya. Jakarta. 75 Hal.

Hatmanti, R., Nuchsin, R., dan Dewi, J. 2009. **Screening Bakteri Penghambat Untuk Bakteri Penyebab Penyakit Pada Budidaya Ikan Kerapu dari Perairan Banten dan Lampung**. Makara, Sains, Vol. 13, No.1 April 2009 81-86.

Hjeltnes, B dan R.J.Robert. 2001. **Vibriosis**. In. Inglis.V, R.J. Robert, N.R.Brogmage. Bacterial Disease of Fish. Blackwell Science Ltd. USA. P. 109-121.

Irianto, A. 2003. **Probiotik Akuakultur**. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 123 hal.

Jawetz E; J.L. Melnick, and E. A. Adelberg. 1984. **Review of Medical Microbiology**. Diterjemahkan oleh dr. Gerard Bonang. CV. EGC. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 547 hal

Joly, E., J. Kirk, K. Jermyn, and J. Williams.1990. Addition Of Heat-Killed Bacteria To *Dictyostelium* Transformants. **An Online Informatics Resource for Dictyostelium**.

Kusnadi, 2003. **Mikrobiologi**. Djambatan. Bandung. 60 hal.

Lay, B. W., 1994. **Analisa Mikroba di Laboratorium**. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta. 168 hal.

Maftuch, 2006. **Karakterisasi Protein Adhesin *Omp Vibrio Alginolyticus* dan Antibodi Hasil Induksinya Serta Pengaruhnya Terhadap Respon Imun Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*)**. Disertasi. Program Doktor. Universitas Brawijaya Malang. Tidak di Publikasikan.

Murdjani, 2002. **Identifikasi dan Patologi Bakteri *Vibrio alginolyticus* Pada Ikan Kerapu Tikus**. Disertasi. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya, Malang. Tidak di Publikasikan.

Murdjani, M., Y. L. Nur'Aini, dan G. Triastutik. 2003. **Hama Penyakit Ikan dan Udang Pada Usaha Pembenihan BBAP**. Situbondo. 17 hal

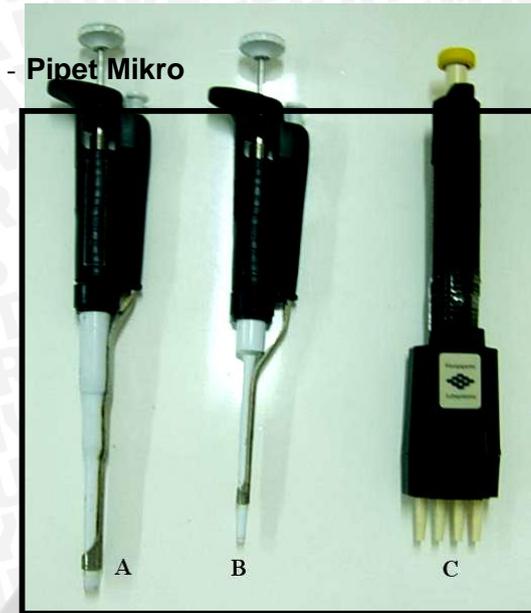
Nazir, M. 1988. **Metode Penelitian**. Ghalia Indonesia. Jakarta. 622 hal

Noel, K. and John. 1984. **Bergey's Manual of systematic Bacteriology**. Volume I. Penerbit Williams and Wilking. USA. 964 page.

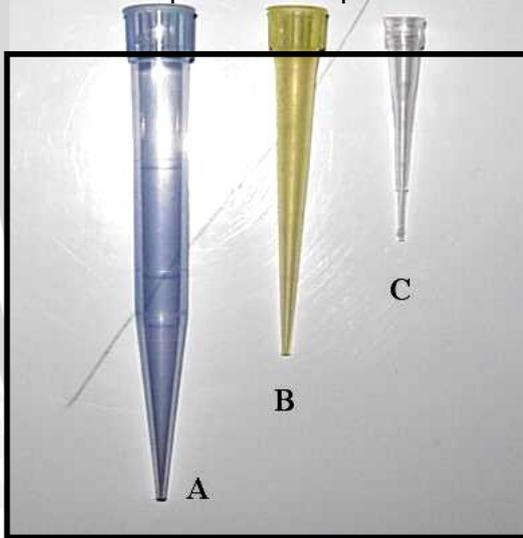
Pelczar, M. J. dan E C S Chan. 1986. **Dasar – dasar Mikrobiologi 1**. UI-Press. Jakarta. 443 hal.

- \_\_\_\_\_. 1988. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press) 2005. 997 hal.
- \_\_\_\_\_. 2009. **Dasar-dasar Mikrobiologi 2**. Alih bahasa : R.S. Hadioetomo, T. Imas, S. S. Tjitrosomo, S. L. Angka. Penerbit Universitas Indonesia. 443 hal.
- Pradhika dan Indra. 2008. **Mikro-Ba Nget**, www.Ekmon-saurus.blogspot.com. diakses tanggal 13 Februari 2010
- Prajitno, A. 2005. **Diktat Kuliah Parasit dan Penyakit Ikan**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 104 hal.
- Prajitno, 2007. **Penyakit Ikan – Udang: Bakteri**. Penerbit Universitas Negeri Malang. Malang. ISBN 978-979-3506-89-0. 115 hal.
- Salle, A. J. 1961. **Fundamental Principles of Bacteriology**. Mc Graw-Hill Book Company,inc. New York. 812 pp.
- Sumisdyanto. 2009. **Pengaruh Immunostimulan Bakterin *Vibrio alginolyticus* Terhadap Respon Immun Seluler Udang Windu (*Penaeus monodon*) Yang Dipapar Bakteri *Vibrio alginolyticus***. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Malang. Tidak di Publikasikan.
- Tompo, A dan E. Sutianingsih. 2004. **Isolasi dan Karakterisasi Bakteri *Vibrio* Pada Tambak Udang Yang Menggunakan Immunostimulan Untuk Pengendalian Penyakit**. Proseding Pengendalian Penyakit pada Ikan dan Udang Berbasis Imunisasi dan Biosecurity. Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV.18-19 Mei 2004. Purwokerto. Hal 1-6
- Viramedika. 2008. **Membedakan Bakteri Gram Positif dan Negatif**. <http://scrib.com/doc/25146430>. Diakses 7 Februari 2010.
- Waluyo, L. 2008. **Teknik Metode Dasar Mikrobiologi**. UPT Penerbitan Universitas Muhamadiyah Malang. 353 hal
- Zhang H. Z., P. G. Meaden, and B. Austin. 2001. **Duplication of Hemolysin Genes in a Virulent Isolate of *Vibrio harveyi***. Department of Biological Sciences, Heriot-Watt University, Riccarton, Edinburgh EH14 4AS, Scotland. Applied and Environmental Microbiology, July 2001, p. 3161-3167, Vol

Lampiran 1. Peralatan Penelitian

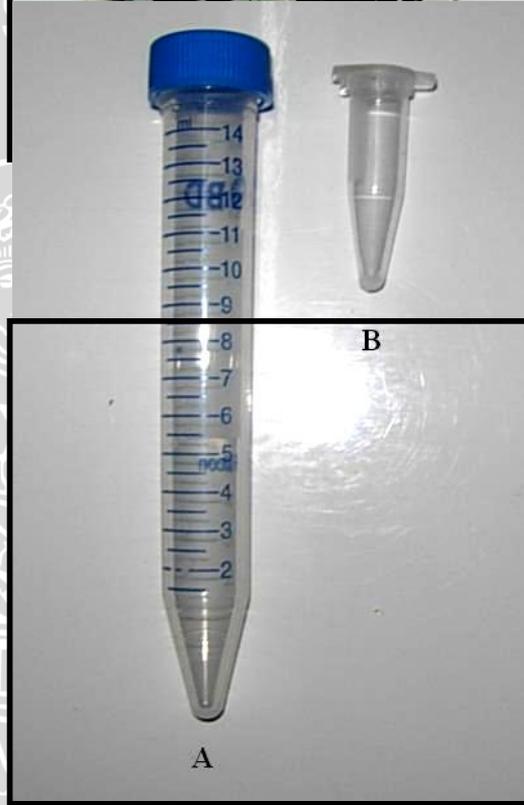


- A. Pipet Mikro 1000  $\mu$ l
- B. Pipet Mikro 200  $\mu$ l
- C. Pipet Mikro 50  $\mu$ l



- Tips

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



Falcon dan Eppendorf

- A. Falcon 15cc
- B. Eppendorf

Lampiran 1 (Lanjutan).

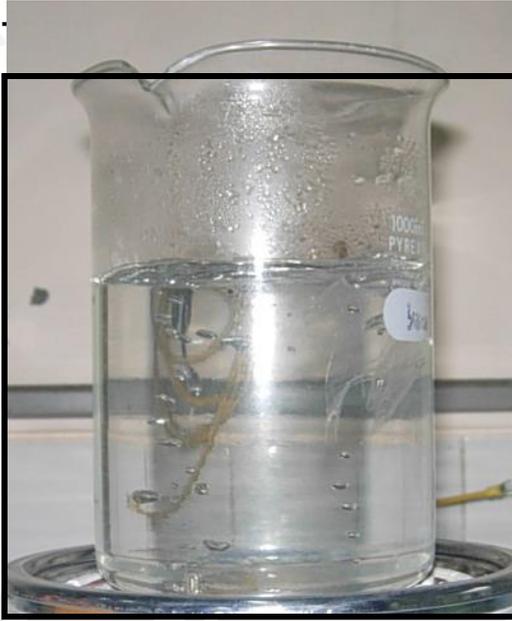
- Inkubator



- Refrigerated centrifuge



Lampiran 1 (Lanjutan).



- Bunsen



- Mikroskop



- Laminary cabinet



Lampiran 2. Kultur Bakteri *V. alginolyticus*

Pembuatan biakan bakteri *V. alginolyticus*  
pada media TCBSA

Diinkubasi pada suhu ruangan selama 24 jam

Pemberian BHI secukupnya pada media  
TCBSA yang berisi hasil biakan bakteri

Bakteri dikerok kemudian dimasukkan kedalam  
larutan BHI

Bakteri dalam larutan BHI dimasukkan  
kedalam botol yang berisi TCG

Diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam

Lampiran 3. P

entrifuge.

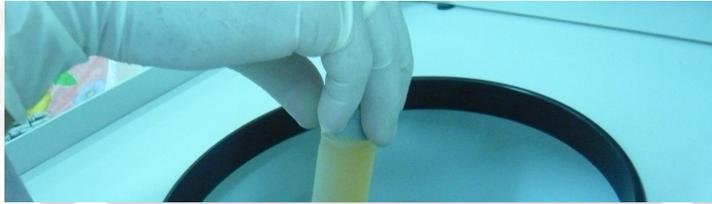


A  
*V. alginolyticus* yang sudah dipanaskan 100°C selama 10 menit

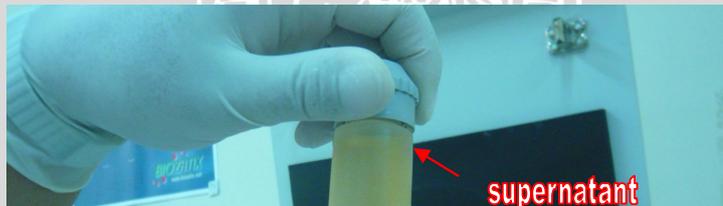


B  
*V. alginolyticus* dimasukkan dalam tabung falcon

Lampiran 3 (Lanjutan).



C  
Dimasukkan ke dalam sentrifuge



D  
Menghasilkan supernatant dan pellet

### Lampiran 4. Proses Uji Tantang



**A**  
Media TCBSA steril disiapkan

**B**  
Bakterin disuspensikan dengan  
PBS 1:1 kemudian divortex



**D**  
Kertas cakram disiapkan dan  
ditetesi bakterin sesuai perlakuan

**C**  
Pembuatan dosis bakterin  
sesuai perlakuan 0%, 50%, 100%



Lampiran 4 (Lanjutan)



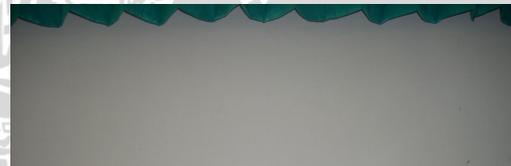
**E**

Dengan cotton bud bakteri uji diambil dan diratakan pada media TCBSA



**F**

Kertas cakram yang sudah ditetesi bakterin diletakan pada media TCBSA sesuai perlakuan



**H**

Pengukuran daerah hambatan dengan mistar Setelah diinkubasi 24 jam



**G**

Media TCBSA dibungkus dengan koran dan diinkubasi pada suhu ruang (30°C) selama 24 jam

## Lampiran 5. Analisa Data Zona Daerah Hambat.

### a. Tabel Hasil Pengukuran Zona Daerah Hambat (mm)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (0 %)	6,0	6,0	6,0	18,0	6,0
B (50 %)	6,0	7,0	8,0	21,0	7,0
C (100 %)	9,0	9,0	10,0	28,0	9,3
Total				67,0	

### Perhitungan

- $FK = G^2/n$   
 $= 67,0^2/9$   
 $= 498,7$
- $JK_{total} = (A1)^2 + (A2)^2 + \dots + (C3)^2 - FK$   
 $= (6,0)^2 + (6,0)^2 + \dots + (10,0)^2 - 498,7$   
 $= 519 - 498,7$   
 $= 20,3$
- $JK_{perlakuan} = (\sum A)^2 + (\sum B)^2 + (\sum C)^2/3 - FK$   
 $= (18,0)^2 + (21,0)^2 + (28,0)^2/3 - 498,7$   
 $= 17,63$
- $JK_{acak} = JK_{total} - JK_{perlakuan}$   
 $= 20,3 - 17,63$   
 $= 2,67$

### b. Tabel Analisa Keragaman/Sidik Ragam Daya Hambat Bakterin

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	17,63	8,815	19,808**	5,14	10,92
Acak	6	2,67	0,445			
Total	8	20,3				

- Karena  $F_{hitung} > F_{1\%}$  atau  $19,808 > 10,92$  \*\* atau berbeda sangat nyata (highly significant). Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji BNT.

c. Perhitungan uji Beda Nyata Terkecil ( BNT ) :

$$\bullet \text{ SED} = \sqrt{\frac{2 \text{ KT acak}}{\mu}} = \sqrt{\frac{2 \times 0,445}{3}}$$

$$\text{SED} = 0,5440$$

- **BNT 5%** = t tabel 5 % x SED  
= 2,447 x 0,5440  
= **1,331**
- **BNT 1%** = t tabel 1 % x SED  
= 3,707 x 0,5440  
= **2,016**

d. Tabel BNT uji daya hambat Bakterin terhadap *V.harveyi*

Rata2 Perlakuan	A = 6,0	B = 7,0	C = 9,3	Notasi
A = 6,0	-	-	-	a
B = 7,0	1,0 <sup>ns</sup>	-	-	a
C = 9,3	3,3 **	2,3**	-	b

Keterangan: Notasi sama berarti tidak berbeda  
Ns: tidak berbeda nyata  
\*\*: berbeda sangat nyata

e. Tabel Polinomial Orthogonal

Perlakuan ( % )	Total (Ti)	Pembanding (Ci)	
		Linear	Kuadratik
A = 0	18,0	-1	+1
B = 50	21,0	0	-2
C = 100	28,0	+1	+1
Q = CiTi		10,0	4,0
Kr = ( Ci <sup>2</sup> )*r		2x3 = 6	6x3 = 18
JK = Q <sup>2</sup> /Kr		16,67	0,88

f. Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F5%	F1%
Perlakuan	2	17,63	8,815			
- Linear	1	16,67	16,67	37,460 **	5,99	13,75
- Kuadratik	1	0,88	0,88	1,977 *	5,99	13,75
Acak	6	2,67	0,445			
Total	8	20,3				

$$R^2 \text{ Linear} = \frac{\text{JK regresi linear}}{\text{JK regresi linear} + \text{JK Acak}} = \frac{16,67}{16,67 + 2,67} = \mathbf{0,8619}$$

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{\text{JK regresi kuadratik}}{\text{JK regresi kuadratik} + \text{JK Acak}} = \frac{0,88}{0,88 + 2,67} = \mathbf{0,2478}$$

Berdasarkan hasil sidik ragam regresi maka regresi linear lebih sesuai dengan kurva respon karena memiliki nilai  $R^2$  linear lebih besar dari  $R^2$  kuadratik.

**g. Mencari Persamaan Regresi Linear :  $y = b_0 + b_1x$**

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

$$b_0 = y - b_1x$$

x	y	xy	$x^2$
0	6,0	0	0
50	7,0	25	2500
100	9,3	167	10000
$x = 150$	$y = 22,3$	$xy = 1280$	$x^2 = 12500$
$X = 50$	$Y = 7,43$		

$$b_1 = \frac{xy - [x \ y/n]}{x^2 - [(x)^2/n]} = \frac{1280 - [(150)(22,3)/3]}{12500 - [(150)^2/3]} = \frac{1280 - 1,115}{12500 - 7500} = \mathbf{0,2557}$$

$$b_0 = y - b_1x = 7,43 - [(0,2557)(50)] = 7,43 - 12,785 = \mathbf{-5,355}$$

Sehingga persamaan Regresi linearnya menjadi :  $y = -5,355 + 0,2557x$

$$x = 0 \text{ maka } y = -5,355 + 0,2557(0) = -5,355$$

$$x = 50 \text{ maka } y = -5,355 + 0,2557(50) = 7,43$$

$$x = 100 \text{ maka } y = -5,355 + 0,2557(100) = 20,21$$

$$R^2 = 0,8619$$

$$r = 0,8619 = 0,9283 = \mathbf{0,92}$$