

PENGARUH PERBEDAAN PEMBERIAN KONSENTRASI SUPERNATAN***Vibrio probioticus* AJ345063 SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK****TERHADAP AKTIFITAS BAKTERI *Vibrio alginolyticus* SECARA IN-****VITRO****SKRIPSI****MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN****BUDIDAYA PERAIRAN****OLEH :****NESIA EKA PUSPITA****0610850053****UNIVERSITAS BRAWIJAYA****FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN****MALANG****2011**

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT pemilik segala ilmu dan satu-satunya pemberi hidayah serta ilham, shalawat dan salam senantiasa tercurah ke pangkuan hamba Allah SWT terkasih Rasulullah SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi yang berjudul “Pengaruh Perbedaan Pemberian Konsentrasi *V. probioticus* AJ345063 Sebagai Kandidat Probiotik Terhadap Aktivitas Bakteri *Vibrio alginolyticus* Secara Invitro”.

Skripsi ini disusun berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan pada bulan Oktober sampai dengan Desember 2010 yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang.

Atas terselesaikannya skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- Bapak Ir. Mohammad Fadjar, MSc. selaku dosen Pembimbing I dan Ibu Ating Yuniarti S.Pi, M. Aqua selaku dosen Pembimbing II atas arahan dan bimbingannya selama penelitian hingga tersusunnya skripsi

- Kedua orang tua terkasih dan adik tersayang serta semua pihak yang telah memberikan dorongan dan bantuan selama penelitian dan penyusunan skripsi

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu saran dan kritik yang bersifat membangun sangat penulis harapkan.

Semoga tulisan ini bermanfaat bagi pihak yang berminat dan memerlukannya.

Malang, Januari 2011

Penulis

DAFTAR ISI

	Hal
RINGKASAN	<i>i</i>
KATA PENGANTAR	<i>ii</i>
DAFTAR ISI	<i>iii</i>
DAFTAR TABEL	<i>v</i>
DAFTAR GAMBAR	<i>vi</i>
DAFTAR LAMPIRAN	<i>vii</i>
I PENDAHULUAN	
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 Penelitian.....	4
II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Vibrio alginolyticus</i>	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	5
2.2.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan.....	6
2.2.3 Habitat dan Penyebaran.....	7
2.1.4 Infeksi dan Tanda Penyerangan.....	7
2.2 Karakter <i>Vibrio probioticus</i> AJ345063.....	8
2.3 <i>Vibrio sp</i> sebagai kandidat probiotik.....	8
2.4 Uji <i>well diffusion</i>	11
III MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian.....	14
3.1.1 Alat-alat Penelitian.....	14
3.1.2 Bahan-bahan Penelitian.....	14
3.2 Metode Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	15
3.3 Rancangan Penelitian.....	17
3.4 Prosedur Penelitian.....	18
3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	18
3.4.2 Pembuatan Media.....	18
3.4.3 Persiapan Bakteri Uji.....	21
3.4.4 Uji Tantang Bakteri <i>Vibrio probioticus</i> AJ345063 dengan <i>Vibrio alginolyticus</i>	21
3.5 Parameter Uji.....	24
3.5.1 Parameter Utama.....	24
3.5.2 Parameter Penunjang.....	24
3.6 Analisa Data.....	24
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Kultur <i>Vibrio alginolyticus</i> dan <i>Vibrio probioticus</i> AJ345063.....	25

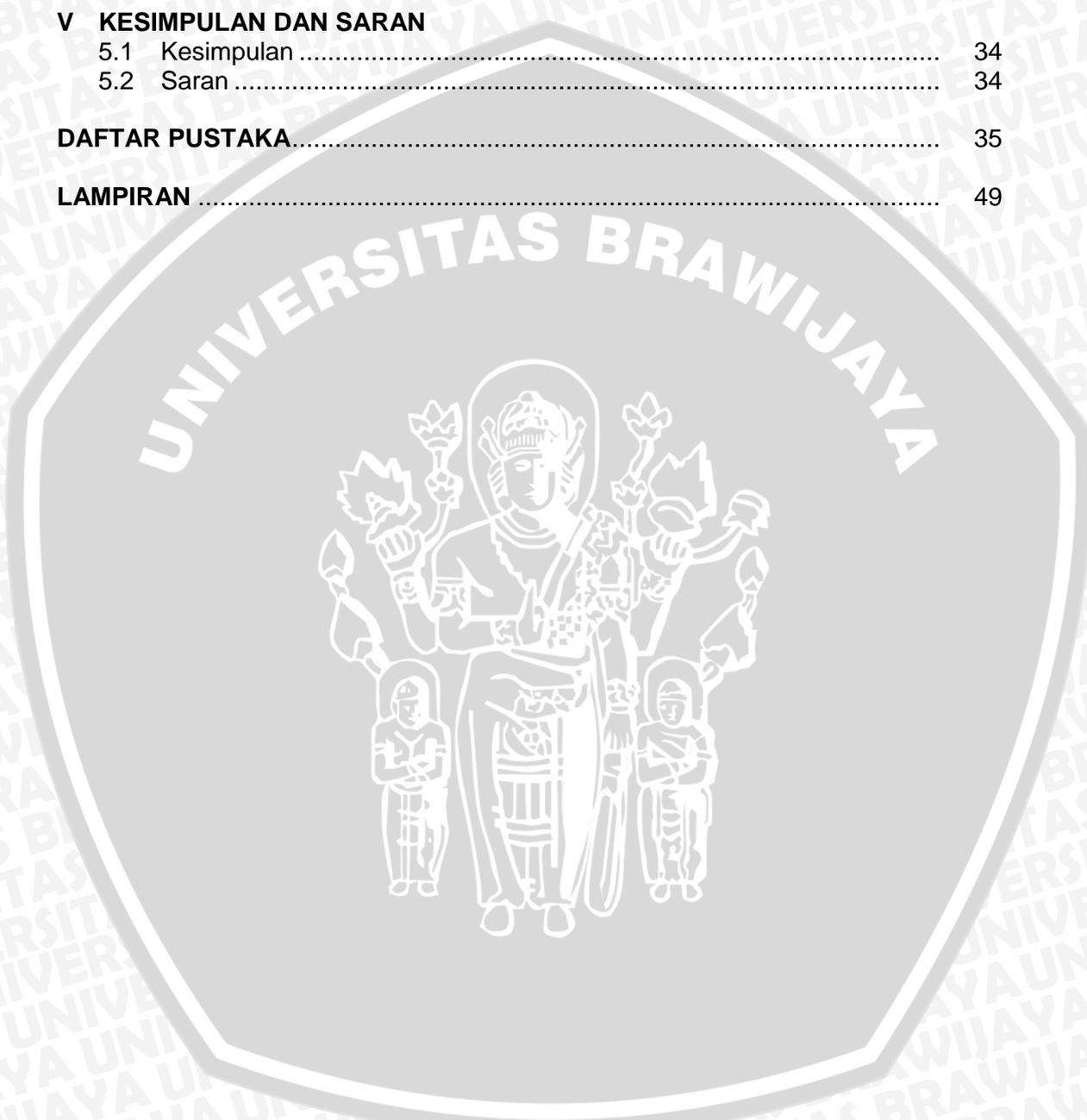
	18
4.3 Supernatan <i>Vibrio probioticus</i> AJ345063	27
4.4 Zona Hambat Supernatan <i>Vibrio probioticus</i> AJ345063 Terhadap Aktifitas <i>Vibrio alginolyticus</i> Menggunakan Well Diffusion (Difusi Sumuran)	27
4.4 Lingkungan Hidup Bakteri	33
4.5 Suhu	33

V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	34

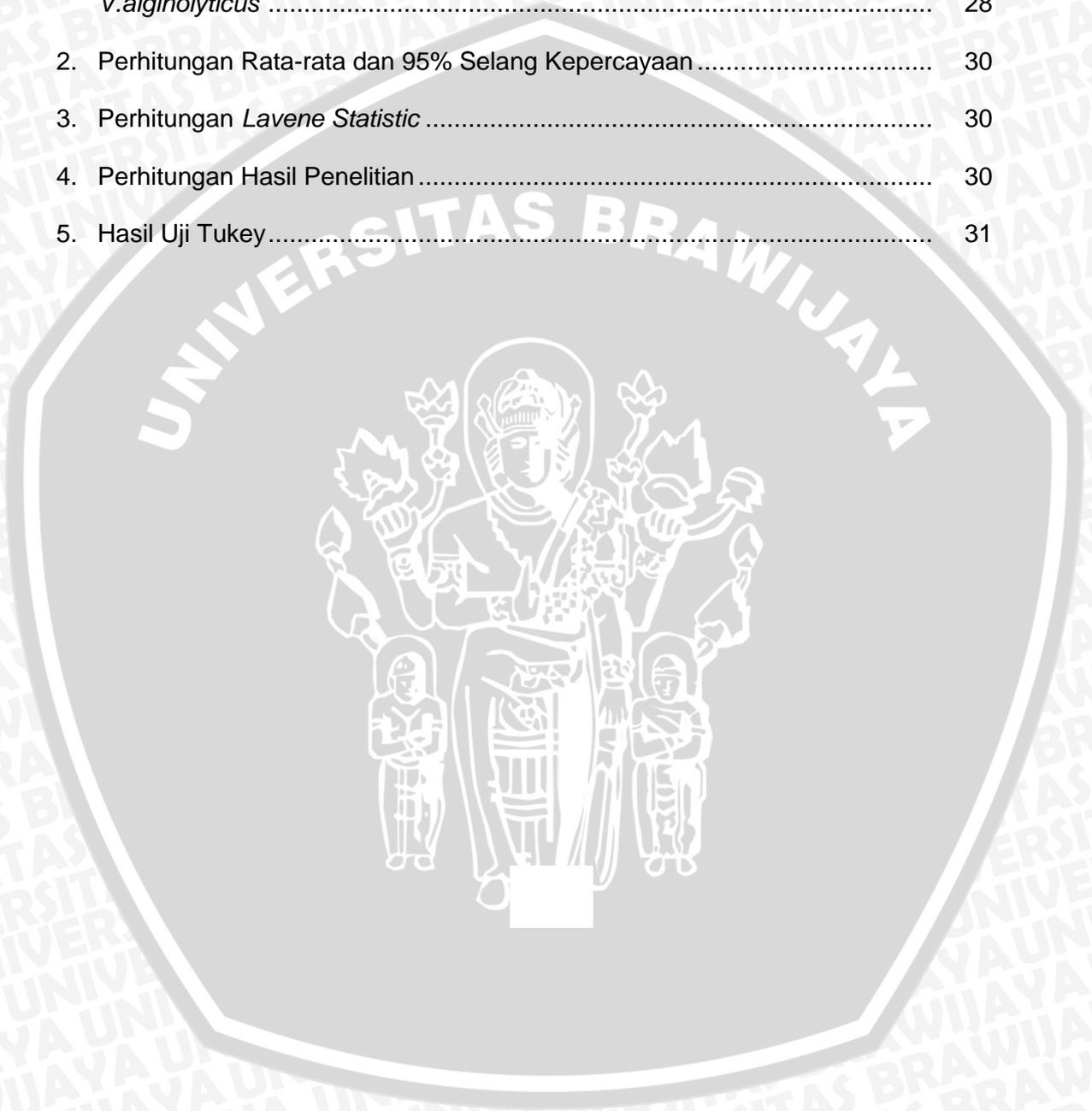
DAFTAR PUSTAKA	35
-----------------------------	----

LAMPIRAN	49
-----------------------	----



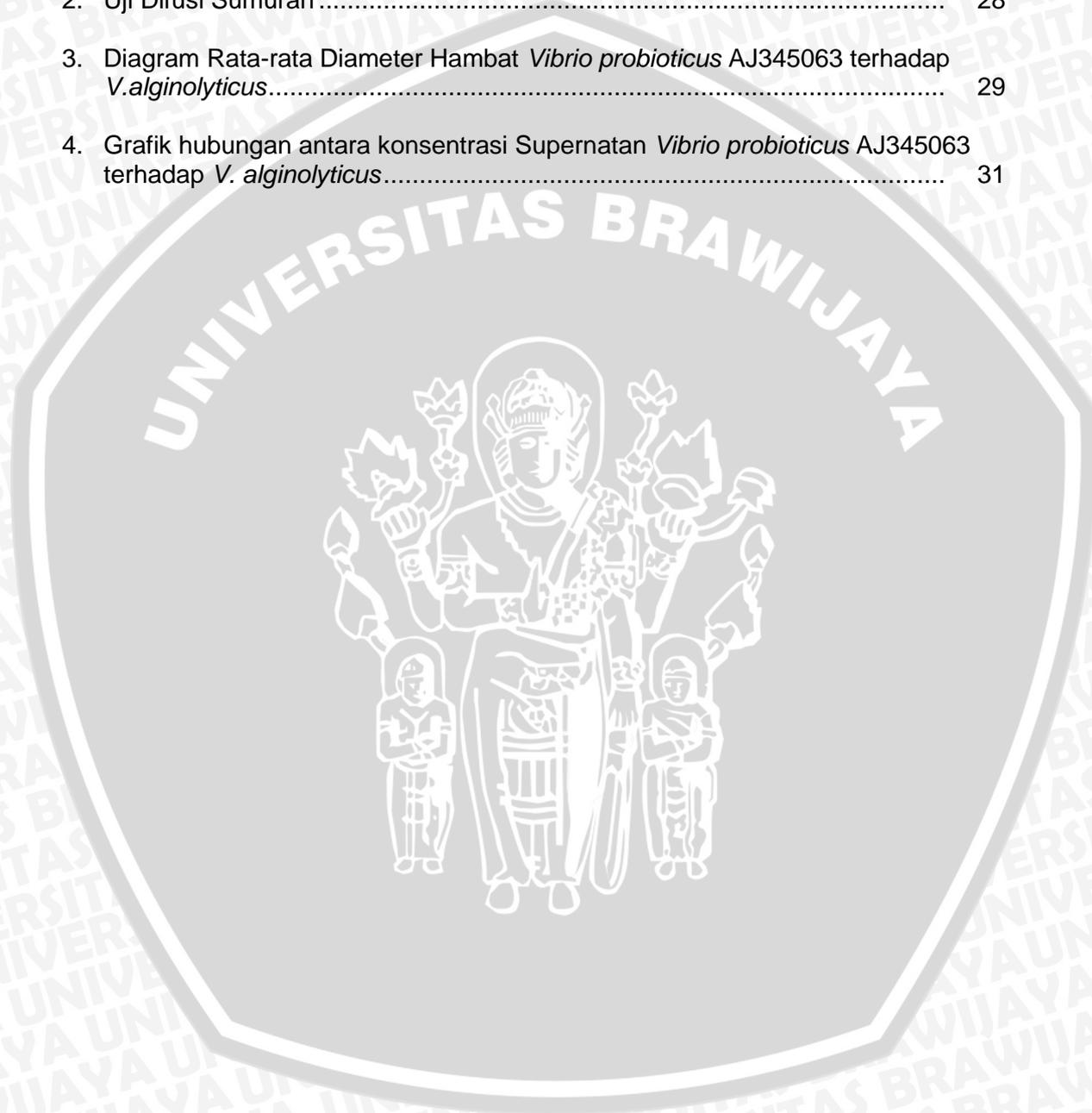
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil dan Rata-rata Diameter Hambat <i>Vibrio probioticus</i> AJ345063 terhadap <i>V.alginolyticus</i>	28
2. Perhitungan Rata-rata dan 95% Selang Kepercayaan	30
3. Perhitungan <i>Lavene Statistic</i>	30
4. Perhitungan Hasil Penelitian	30
5. Hasil Uji Tukey	31



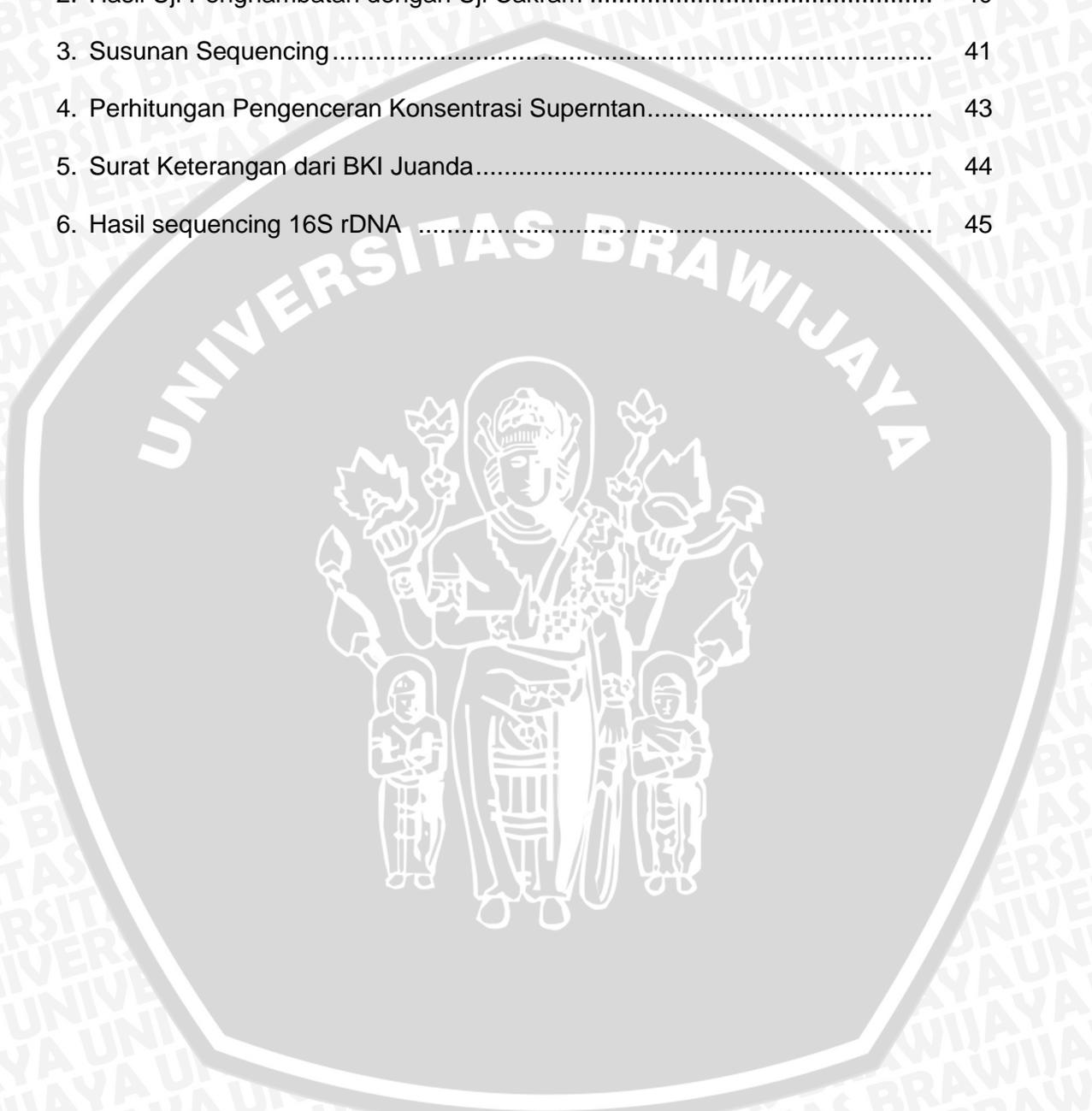
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Pewarnaan <i>Vibrio probioticus</i> AJ345063.....	26
2. Uji Difusi Sumuran	28
3. Diagram Rata-rata Diameter Hambat <i>Vibrio probioticus</i> AJ345063 terhadap <i>V.alginolyticus</i>	29
4. Grafik hubungan antara konsentrasi Supernatan <i>Vibrio probioticus</i> AJ345063 terhadap <i>V. alginolyticus</i>	31



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Identifikasi Bakteri	39
2. Hasil Uji Penghambatan dengan Uji Cakram	40
3. Susunan Sequencing	41
4. Perhitungan Pengenceran Konsentrasi Superntan	43
5. Surat Keterangan dari BKI Juanda	44
6. Hasil sequencing 16S rDNA	45



RINGKASAN

NESIA EKA PUSPITA. Pengaruh Perbedaan Pemberian Konsentrasi Supernatan *Vibrio probioticus* AJ345063 Sebagai Kandidat Probiotik Terhadap Aktivitas Bakteri *Vibrio alginolyticus* Secara Invitro (di bawah bimbingan **Ir. Mohammad Fadjar, MSc.** dan **Ating Yuniarti, S.Pi, M. Aqua**)

Penggunaan obat antibiotik telah menunjukkan kemajuan dalam upaya penanggulangan penyakit infeksi, tetapi penggunaan yang terus menerus dan tidak terarah menimbulkan berbagai masalah baru, yaitu dapat menimbulkan efek samping yang dapat merugikan, apalagi bila penggunaannya dengan dosis yang tidak tepat sering mengakibatkan bakteri menjadi resisten. Dalam rangka melepaskan diri dari sifat resistensi bakteri terhadap antibiotik para ahli mikrobiologi seakan berkejaran dengan bakteri dalam melakukan adu kreasi dan inovasi. Ketika para ahli mikrobiologi berhasil menemukan antibiotik golongan baru, bakteri pun mengembangkan kemampuan pertahanan (resistensi) yang lebih tangguh melalui mekanisme perubahan genetik (mutasi). Probiotik adalah mikroorganisme yang memiliki kemampuan mendukung pertumbuhan dan produktifitas udang. Penerapan probiotik pada udang selain berfungsi untuk menyeimbangkan mikroorganisme dalam pencernaan agar tingkat serapannya tinggi, probiotik juga bermanfaat menguraikan senyawa-senyawa sisa metabolisme dalam air.

Kandidat probiotik yang digunakan pada penelitian ini adalah supernatan bakteri *V. probioticus* AJ345063, bakteri ini diharapkan dapat menjadi bakteri antagonis yang dapat digunakan sebagai biokontrol adalah menghasilkan senyawa penghambat pertumbuhan patogen, terjadi kompetisi pemanfaatan senyawa tertentu atau kompetisi tempat menempel, mempertinggi tanggap kebal inang, meningkatkan kualitas air dan adanya interaksi dengan fitoplankton atau zooplankton. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi supernatan bakteri *V. probioticus* AJ345063 yang dibutuhkan bakteri *Vibrio alginolyticus* untuk menghambat aktifitasnya. Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, pada bulan Oktober sampai dengan Desember 2010.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen, sedangkan untuk menganalisa hasil digunakan metode ANOVA one way dengan 5 perlakuan yang masing-masing diulang 3 kali. Perlakuan pada penelitian ini adalah konsentrasi supernatan *V. probioticus* AJ345063, yaitu konsentrasi 0% (kontrol), 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Sebagai parameter utama pada penelitian ini adalah diameter hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran yang mengandung supernatan *V. probioticus* AJ345063, sedangkan parameter penunjangnya adalah pH dan suhu inkubator.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa supernatan *V. probioticus* AJ345063 dengan konsentrasi yang berbeda mempunyai pengaruh yang berbeda nyata terhadap diameter hambat bakteri *Vibrio alginolyticus*. Rata-rata untuk masing-masing perlakuan yaitu: perlakuan A (12,5%) menghasilkan rerata diameter hambat 7,1667 mm, perlakuan B (25%) dengan rerata 9,333 mm, perlakuan C (50%) dengan rerata 9,667 mm, perlakuan D (100%) dengan rerata 10 mm. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi supernatan *V. probioticus* AJ345063, maka diameter hambat yang terbentuk semakin besar. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disarankan untuk menggunakan konsentrasi supernatan *V. probioticus* AJ345063 25% untuk menghambat aktifitas bakteri *Vibrio alginolyticus*.

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Indonesia adalah negara kepulauan terbesar di dunia dengan jumlah pulau kurang lebih 17.000-an pulau besar dan kecil, juga memiliki panjang pantai terpanjang kedua di dunia. Sebagai negara kepulauan yang dikelilingi laut, Indonesia mempunyai sumber daya hayati maupun non-hayati (Kordi, 2004).

Masalah terbesar yang sering dianggap serius menjadi penghambat budidaya ikan dan udang adalah munculnya serangan penyakit. Serangan penyakit dapat menyebabkan pertumbuhan ikan menjadi sangat lambat (kekerdilan), yang berarti akan meningkatkan biaya produksi dan pada tahap lanjut serangan penyakit dan gangguan hama tidak hanya menyebabkan menurunnya hasil panen (produksi) tetapi juga dapat menyebabkan kegagalan panen (Kordi, 2004).

Menurut definisinya penyakit diartikan sebagai suatu proses atau kondisi yang abnormal dari tubuh atau bagian-bagian tubuh ikan yang mempunyai suatu karakteristik yang membedakannya dengan keadaan normal (Manoppo, 1995 *dalam* Anonymous, (2010a). Menurut Afrianto dan Liviawaty (1992) *dalam* Anonymous (2010a), penyakit ikan adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan, baik secara langsung maupun tidak langsung. Gangguan ini dapat disebabkan oleh organisme lain (pengganggu), pakan maupun kondisi lingkungan yang kurang mendukung kehidupan ikan.

Bakteri vibrio penyebab vibriosis masih merupakan masalah utama bagi industri budidaya ikan kerapu yang menyebabkan kematian massal. Bakteri patogen yang utama adalah *Vibrio alginolyticus*. Kondisi ini menyebabkan penanggulangan penyakit tersebut perlu mendapat perhatian dan penanganan secara khusus (Fahri, 2009).

Pengendalian penyakit dapat dilakukan dengan penggunaan berbagai jenis antibiotika seperti Chloramfenikol, eritromisina dan oksitetrasiklin. Sifat lain yang

tidak kalah penting adalah sifat proteolitik yang berkaitan dengan mekanisme infeksi bakteri (Fahri, 2009). Pemakaian antibiotik atau bahan kimia lainnya sebenarnya dapat berdampak negatif bagi lingkungan sekitar maupun ikan itu sendiri, disamping itu harga bahan kimia tersebut terlampau mahal.

Pada awalnya, penggunaan obat antibiotik telah menunjukkan kemajuan dalam upaya penanggulangan penyakit infeksi, tetapi penggunaan yang terus menerus dan tidak terarah menimbulkan berbagai masalah baru, yaitu dapat menimbulkan efek samping yang dapat merugikan, apalagi bila penggunaannya dengan dosis yang tidak tepat sering mengakibatkan bakteri menjadi resisten. Dalam rangka melepaskan diri dari sifat resistensi bakteri terhadap antibiotik para ahli mikrobiologi seakan berkejaran dengan bakteri dalam melakukan adu kreasi dan inovasi. Ketika para ahli mikrobiologi berhasil menemukan antibiotik golongan baru, bakteri pun mengembangkan kemampuan pertahanan (resistensi) yang lebih tangguh melalui mekanisme perubahan genetik (mutasi). Siklus ini terus berlangsung hingga saat ini, akibatnya penyakit infeksi semakin sulit diatasi dan perang melawan penyakit infeksi masih sulit diprediksi kapan akan berakhir jika hanya mengandalkan amunisi antibiotik. Seiring meluasnya sifat resistensi bakteri terhadap antibiotik, para ahli mikrobiologi terus melakukan penelitian dan pengembangan untuk mencari langkah-langkah terobosan yang lebih mengedepankan pendekatan "persahabatan" (Latif, 2009).

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang dapat memberikan keuntungan bagi inangnya, probiotik akan lebih baik dalam fungsi fisiologisnya, dikarenakan mikroorganisme yang menguntungkan sengaja diberikan pada ikan tersebut. Penerapan probiotik tujuannya untuk mengurangi penggunaan antibiotik dalam pencegahan atau penyembuhan penyakit. Hal ini tidak disadari oleh para petani ikan karena apabila penggunaan antibiotik yang berlebihan (melebihi dosis) akan menimbulkan resistensi pada bakteri patogen sehingga bakteri patogen tidak dapat diatasi oleh antibiotik (Perikanan Unirow Tuban, 2010).

Beberapa spesies bakteri laut telah diketahui merupakan sumber antibiotik baru sehingga dapat dimanfaatkan untuk menanggulangi beberapa patogen yang resisten antibiotik (Saz *et al*, 1963)

Kultur bakteri, digunakan sebagai probiotik, diperoleh dari hatchery udang komersial di Ekuador sejak 1993. Kultur pada *Aeromonas salmonicida* 256/91, *Vibrio* serotipe *anguillarum* 1 VIB253, *V. ordalii* 17 K dan serotipe *ruckeri* *Yersinia* 1 Ex5 diperoleh dari sakit salmonids di Skotlandia, Tasmania, Norwegia dan Inggris, masing-masing (Austin *et al*, 1995).

1.2 Rumusan Masalah

Bakteri *Vibrio alginolyticus* merupakan bakteri virulen pada budidaya air laut. Bakteri *Vibrio* bersifat patogen oportunistik pada budidaya air payau dan laut karena dapat bertindak sebagai patogen primer dan sekunder. Sebagai patogen primer, bakteri masuk ke dalam tubuh udang melalui kontak langsung. Sedangkan sebagai patogen sekunder, bakteri menginfeksi udang yang telah terserang penyakit lain. (Fiegel, 1992 dalam Prajitno, 2007).

Sejalan dengan kemajuan teknologi, probiotik juga dimanfaatkan dalam akuakultur. Probiotik adalah penggunaan bakteri atau mikroba menguntungkan untuk meningkatkan kesehatan ekosistem tambak, kesehatan udang maupun meningkatkan sistem imun dari inang dan mengendalikan atau menghambat mikroba patogen (Perikanan Unirow Tuban, 2010).

Vibrio sp ketegangan NM 10 bisa menghasilkan zona yang jelas besar penghambatan terhadap *P. piscicida* K-III (diameternya 29,2 mm) dan *Escherichia coli* IAM 1264 (diameternya 24,7 mm) dan melawan *Vibrio vulnificus* RIMD 2219009 (diameternya 14,6 mm) dan *Enterococcus seriolicida* YT-3 (diameternya 12,3 mm), tetapi tidak ada zona yang jelas menunjukkan bahwa zat antibakteri yang dihasilkan oleh *Vibrio sp* berjenis tertentu. Seperti *Vibrio sp*. NM strain 10 dapat tumbuh pada

suhu berkisar antara 15 hingga 35 ° C, aktivitas antibakteri diukur setelah inkubasi dalam suhu yang berkisar selama 24 jam (Sugita *et al.*, 1997).

Dengan adanya pembuatan supernatan bakteri *Vibrio probioticus* AJ345063 diharapkan mampu menghambat aktifitas bakteri yang diinginkan. Pemberian konsentrasi yang berbeda diharapkan dapat mengetahui konsentrasi optimal dalam proses menghambat aktifitas bakteri *V. alginolyticus*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui konsentrasi supernatan bakteri *V. probioticus* AJ345063 yang dibutuhkan bakteri *V. alginolyticus* untuk menghambat aktifitasnya.

1.4 Kegunaan Penelitian

Dari hasil penelitian yang dilakukan diharapkan berguna untuk memberikan informasi yang berguna untuk kemajuan dunia perikanan ramah lingkungan dengan menggunakan bakteri *V. probioticus* AJ345063.

1.5 Hipotesis

H0 : diduga konsentrasi supernatant bakteri *V. probioticus* AJ345063 tidak dapat menghambat aktifitas bakteri *V. alginolyticus*.

H1 : diduga konsentrasi supernatant bakteri *V. probioticus* AJ345063 dapat menghambat aktifitas bakteri *V. alginolyticus*.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, pada bulan Oktober sampai dengan Desember 2010.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi *Vibrio alginolyticus*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi bakteri *V. alginolyticus* menurut Pacini (1854) dalam Fahri (2009) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gamma Proteobacteria

Order : Vibrionales

Family : Vibrionaceae

Genus : *Vibrio*

Species : *Vibrio alginolyticus*

Bakteri adalah makhluk hidup yang sangat kecil dan hanya dapat dilihat dengan mikroskop. Untuk menyelidiki ukuran bakteri, dalam pemeriksaan mikrobiologis biasanya digunakan satuan mikron (diberi simbol huruf μm), seperti misalnya pengukuran virus (Irianto, 2005). Menurut Pelezar dan Chan (2008), pengertian bakteri adalah sel prokariotik yang khas, uniseluler dan tidak mengandung struktur yang terbatas membran di dalam sitoplasmanya.

Vibrio adalah suatu jenis bakteri gram-negatif yang mempunyai suatu tangkai yang bentuknya bengkok dan secara khas ditemukan pada air laut, *Vibrio* bersifat fakultatif anaerob positif test untuk oksidase dan tidak membentuk spora. Semua anggota jenis ini adalah motil (bergerak) dan mempunyai kutub flagella dengan sarung pelindung. Sejarah evolusi suatu ras terbaru telah dibangun didasarkan pada suatu deretan gen (analisa urutan multi-locus). Semua kelompok spesies yang hidup dalam air, bakteri berbentuk koma dalam keluarga Vibrionaceae. Beberapa jenis menyebabkan penyakit serius pada manusia dan juga hewan. Bakteri ini adalah termasuk dalam bakteri gram-negatif, untuk bakteri yang mampu bergerak

(dengan satu sampai tiga flagella), dan tidak memerlukan oksigen. Sel bakteri dibengkokkan seperti tangkai, tunggal atau meregangkan bersama-sama dalam bentuk S atau berpilin. Dua jenis mengakibatkan penyakit pada manusia satu penyebab kolera, diarrhea hasil bakteri akut lain (Fahri, 2009).

Bakteri *V. alginolyticus* semula diketahui sebagai *V. parahaemolyticus* biotype II, tetapi dalam Bergey's Manual of Determinative Bacteriology edisi kedelapan tahun 1984 bakteri ini dikenal sebagai *V. alginolyticus* (Maftuch, 2006)

Koloni berukuran 0.8-1.2 μm yang berwarna kuning pada media TCBSA. Ciri lain merupakan gram negatif, motil, bentuk batang bengkok. Fermenter glukosa, laktosa, sukrosa dan maltose. Bakteri *V. alginolyticus* memiliki flagelata yang bercabang ke samping dan bergrombol dalam media padat kompleks (Noel *et al*, 1984).

2.1.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Ketika sel bakteri diinokulasi dalam media yang terdiri dari bahan esensial untuk pertumbuhan, sel tersebut akan mengakumulasi nutrien-nutrien, sintesis unsur pokok sel baru, tumbuh pada ukurannya, replikasi materi genetiknya dan dengan cepat membuat dinding sel baru dan terpisah menjadi dua. Jadi satu sel menjadi dua dalam waktu selanjutnya menjadi empat. Tipe pertumbuhan dengan cara ganda disebut pertumbuhan eksponensial dan waktu antara pembelahan sel disebut pengadaaan atau waktu penggenerasian (Nicklin, *et.al*, 1999).

Vibrio spp bersifat anaerobik fakultatif dimana metabolismenya dapat dilakukan dengan atau tanpa oksigen (*fermentatif*), selain itu bakteri ini dapat tumbuh dengan baik pada media mineral yang mengandung ammonium, karbon sederhana dan glutamate. Faktor yang mempengaruhi aktifitas dan pertumbuhan bakteri tersebut adalah faktor kualitas air. Faktor kualitas air yang terbukti mempunyai korelasi yang positif terhadap peledakan popplulasi *Vibrio spp* yaitu bahan organik dan suhu air. Perubahan lingkungan yang terjadi sacara mendadak

seperti suhu dan peningkatan bahan organik dapat mengakibatkan meningkatnya jumlah penyakit (Rukyani *et al.* 1992 dalam Berek 2010).

2.1.3 Habitat dan Penyebarannya

V. alginolyticus tersebar luas di lingkungan perairan laut dan sering diisolasi dari ikan, kerang - kerangan dan makanan laut lainnya (Liston dan Baroos, 1973).

Saat ini bakteri *V. alginolyticus* dilaporkan banyak ditemukan pada bahan makanan laut (seafood) di Hongkong dan selalu didapatkan dalam jumlah yang lebih besar daripada bakteri *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus*. Selanjutnya dikemukakan, bahwa hasil pengamatan populasi bakteri pada kerang-kerangan lebih banyak daripada jenis makanan laut lainnya (Chan *et al.*, 1989).

2.1.4 Infeksi dan Tanda-Tanda Penyerangan

Ketika ikan-ikan laut stress atau traumatik, yaitu kondisi tersebut di bawah pengawasan budidaya dan dalam dunia liar, bakteri vibrio dimungkinkan dapat menyebabkan infeksi dimana berbentuk bisul fokal hemoragik pada mulut atau permukaan kulit, atau luka nekrosis fokal lain di dalam otot, lingkaran atau sekitar tepi sirip-sirip. Dimana luka adalah sub-epidermis, daerah terlalu hitam yang tampak pada kulit, dan jika hal ini menjadi borok, dangkal, tapi luas, borok hemoragik dengan putih disekelilingnya (kulit kolagen) dan sebuah lingkaran pigmentasi hitam dihasilkan (Inglis *et al.*, 2003).

Gejala umumnya dimulai dengan kelesuan dan hilangnya selera makan. Penyakit vibriosis juga ditandai dengan kulit menjadi buram (discolored), merah dan nekrosis (mati), sakit seperti melepuh dapat terlihat pada permukaan tubuh, adakalanya pecah pada permukaan kulit menghasilkan luka terbuka. Bintik-bintik darah (Erythema) umum terjadi di sekitar sirip dan mulut. Ketika penyakit menjadi sistemik, dapat menyebabkan exophthalmia ("pop-eye"), dan saluran usus dan dubur menjadi berdarah dan terisi dengan cairan. semua gejala ini dapat disebabkan oleh penyakit bakterial lainnya, dan bukan hanya oleh Infeksi Vibrio. (Reed and Floyd, 1994 dalam Fahri, 2009).

V. alginolyticus juga menginfeksi tubuh ikan dengan berbagai cara. Dengan menggunakan perlekatan dan produksi berbagai toksin, LPS dan enzim. Salah satu yang dapat meningkatkan patogenitas bakteri yaitu adanya faktor virulensi yang berpotensi untuk mengadakan serangan (Evelyn, 1984).

Tingkat perbedaan tingkat keganasan juga disebabkan karena perbedaan target organ dan kemampuan berkembang ditarget organ. Semakin banyak organ vital yang diserang, semakin tinggi suhu air diatas optimal dan semakin kecil ukuran ikan akan semakin tinggi tingkat kematiannya (Kamiso, 1996).

2.2 Karakteristik Bakteri *Vibrio probioticus* AJ345063

Vibrio spp terjadi secara alami pada lingkungan budidaya dan biasanya paling banyak munculnya bakteri selama budidaya udang (Vandenberghé *et al.*, 2003 dalam Fadjar *et al.*, 2009). Dilaporkan jumlah spesies *Vibrio* meningkat secara cepat dalam beberapa decade. Dilaporkan ada 63 lingkungan budidaya yang ditumbuhi spesies *Vibrio* (Thompson, *et al.*, 2004 dalam Fadjar *et al.*, 2009).

Aktifitas bakteri dengan anti *Vibrio* memiliki aplikasi potensial seperti agen biokontrol dan bakteri ini akan dimanfaatkan sebagai pengganti antibiotik selama budidaya udang dengan tidak merugikan lingkungan sekitar. Rangkaian asam pendek dimungkinkan dapat bermanfaat sebagai alternatif pengantar biokontrol untuk menghilangkan vibriosis (Defoirdt *et al.*, 2006b dalam Fadjar *et al.*, 2009). *b*-hydroxybutyrate dan sintesis alami brominasi furanone melindungi gnotobiotic artemia dari isolasi pathogen dengan uji tantangan secara *in vivo*, ditunjukkan secara lengkap yang dihambat adalah pertumbuhan pathogen *Vibrio campbelli*. Anti bakteri *Alteromonas sp.*, ketika dicampur untuk menyerang larva udang, ternyata dapat menekan aktifitas *V. harveyi* M3 dan mengurangi angka kematian dari larva *P. monodon* secara *in vivo* (Abraham, 2004). Cinnamaldehyde dicampur dengan *AI-2 based QS* dalam berbagai macam *Vibrio spp*. Dengan mengurangi ikatan DNA yang mampu pada LuxR menggunakan hasil campuran beberapa perubahan fenotipik

yang ditandai, termasuk menurunkan tingkat virulensi dan stres (Brackman *et al.*, 2008).

Salah satu cara mendapatka bakteri *V. probioticus* adalah dengan identifikasi dari sampel tanah seperti pada lampiran 1, kemudian dengan uji sequencing asam amino 16S rDNA seperti contohnya pada lampiran 6. Setelah itu dengan uji kimia 16S rDNA, hasilnya disesuaikan pada program NCBI untuk mengetahui data gen yang contoh hasilnya dapat dilihat pada lampiran 3, yaitu terdapat susunan asam amino (Fadjar *et al.*, 2009). Sudjadi (2008) mengatakan bahwa dalam ras molekular, pengertian tertentu dari suatu molekul DNA diperoleh dari penetapan urutan nukleotida (sikuensing). Fungsi suatu gena biasanya dapat dapat dideduksi dari urutan nukleotidanya, misalnya dengan membandingkan urutan nkleotida suatu gena yang telah diketahui fungsinya.

Menurut Santosa (2011) dalam Nurhayati *et.al.* (2006) menyatakan bahwa, kondisi penempelan primer ke urutan DNA (*annealing*) adalah 45 °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 homologi yang tinggi dengan urutan nukleotida.

2.3 *Vibrio probioticus* AJ345063 sabagai kandidat pobiotik

Vibrio sp mempunyai sifat-sifat umum yaitu berbentuk batang yang bengkok, mempunyai satu batang cambuk yang yang terletak pada salah satu ujung batangnya (Bonang dan Koeswardono, 1982). *Vibrio sp* mempunyai ukuran panjang 1-3 mikron dan diameter 0,4-0,6 mikron dan dapat tumbuh pada pH 6,4-9,6 dengan pH optimum 7,8-8,0 (Fardiaz, 1983). Pada umumnya bakteri *Vibrio* tumbuh secara optimal pada suhu berkisar dari 18 sampai 37°C (Peleczar dan Chan, 1988).

Menurut Dwidjosepoetro (1989), *Vibrio* termasuk kemoorganotropik, yaitu mikroba yang dapat menggunakan komponen organik sebagai sumber karbon dan energi. Medium yang paling cocok bagi kehidupan bakteri adalah medium yang

isotonis terhadap isi sel bakteri. Broch dan Madigon (1991) menyatakan bahwa *Vibrio sp* bersifat oksidase positif, katalase positif dan dapat menfermentasi gula menjadi asam tanpa membentuk gas. Temperatur pertumbuhan *Vibrio sp* adalah 18 – 30°C, sedangkan *Vibrio cholerae* tidak dapat berkembang dengan baik pada temperature dibawah 15°C (Fardiaz, 1991).

Pada penelitian ini kandidat probiotik yang digunakan adalah bakteri *V. probioticus* AJ345063. Hal tersebut telah dibuktikan dengan hasil analisis filogenetik 16S rRNA, bakteri ini diharapkan dapat menjadi bakteri antagonis seperti yang dikemukakan oleh Verschuere *et al.* (2000) dalam Isnansetyo A. (2005) mengatakan bahwa bakteri antagonis yang dapat digunakan sebagai biokontrol adalah menghasilkan senyawa penghambat pertumbuhan patogen, terjadi kompetisi pemanfaatan senyawa tertentu atau kompetisi tempat menempel, mempertinggi tanggap kebal inang, meningkatkan kualitas air dan adanya interaksi dengan fitoplankton atau zooplankton.

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. Hasil penelitian ini juga diharapkan bakteri *Vibrio sp* dapat menghambat pertumbuhan *V. alginolyticus*. Lebih lanjut (Isnansetyo *et al.*, 2005) Sebagai contohnya *Vibrio sp.* NM 10 yang diisolasi dari *leioognathus nuchalis* bersifat antagonis terhadap *Pasteurella piscicida* karena menghasilkan protein dengan berat molekul kurang 5 kDa. Protein tersebut diduga bacteriocin atau senyawa serupa bacteriocin (*bacteriocin-like substance*).

Dengan menggunakan metode cross bergaris, diamati pertumbuhan bakteri patogen karena efek probiont tersebut. Hasil penggunaan supernatant beku yang digunakan pada kultur kering dan terbentuk zona bening dengan diameter >3 mm pada kultur *A. salmonicida*, *V. anguillarum* dan *V.ordalli*, dan pada *Y. ruckeri* diameter hambatnya lebih rendah. Penelitian ini tetap perhatian agar dalam

interpretasi data sepanjang ada beberapa bukti untuk kehadiran zona kecil bening sekitar kontrol (Austin *et al.*, 1995).

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

Probiotik adalah istilah yang digunakan pada mikroorganisme hidup yang dapat memberikan efek baik atau kesehatan pada organisme lain atau inangnya. Antimikroba adalah suatu zat yang mampu mengganggu pertumbuhan dan metabolisme mikroba. Mekanisme kerja antimikroba antara lain dengan jalan merusak dinding sel, merusak membran sitoplasma, mendenaturasi protein sel dan menghambat kerja enzim dalam sel (Pelezar dan Chan, 1986).

Penggunaan probiotik dapat mengendalikan kualitas lingkungan dan dapat menekan penyakit karena merupakan bakteri menguntungkan yang diharapkan dapat menekan bakteri merugikan. Aplikasi probiotik ditujukan agar media pemeliharaan tetap terjaga kualitasnya dalam arti keseimbangan kandungan bakteri dan gas-gas beracun dapat dinetralkan (Mulyadi *et al.*, 2002).

Simarmata (2006) juga mengatakan mekanisme penggunaan probiotik dalam meningkatkan kualitas air, kesehatan udang dan pengendalian secara biologis dapat diringkas sebagai berikut :

- Menguraikan senyawa toksis (detoksifikasi) dalam ekosistem tambak, terutama NH_3 , NO_2 - dan H_2S dan menguraikan timbunan bahan organik dan detritus pada dasar tambak.
- Antagonisme yaitu mikroba tersebut menghasilkan suatu senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan pathogen.

- Kompetisi yaitu mikroba probiotik berkompetisi dengan mikroba patogen dalam memanfaatkan faktor tumbuh.
- Immunostimulan yaitu mikroba probiotik meningkatkan sistem imun dari inang atau organisme menguntungkan dalam ekosistem tambak.
- Meningkatkan status nutrisi yaitu mikroba probiotik meningkatkan ketersediaan hara dan penguraian hara pada inang.

2.4 Uji *well diffusion* (Difusi Sumuran)

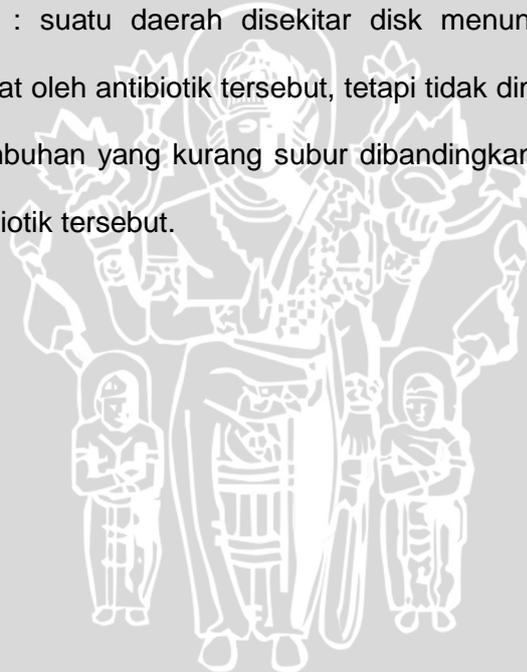
Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas. Metode silinder yaitu meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi tahan karat di atas media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. 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).

Menurut Kirby baeur *dalam* anonymous (2010 b) cara sumuran dapat dilakukan dengan mengambil beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam pada agar. Disuspensikan dalam 0,5 ml BHI cair kemudian diinkubasi selama 5-8 jam pada 37 C. Suspensi tersebut ditambah aquades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar konsentrasi kuman 10⁸ CFU per ml. Untuk

membuat sumuran dilakukan dengan cara kapas lidi steril dicelupkan kedalam suspensi kuman, lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapas tidak terlalu basah. Kemudian dioleskan pada permukaan media hingga merata. Pada agar tersebut dibuat sumuran dengan garis tengah tertentu sesuai dengan kebutuhan. Kedalam sumuran diteteskan larutan antibiotik yang digunakan, inkubasi 37⁰ C selama 18-24 jam.

Cara membaca hasil dari metode sumuran adalah :

- Zone Radikal : suatu daerah disekitar disk dimana sama sekali tidak diketemukan adanya pertumbuhan bakteri. Potensi antibiotik diukur dengan mengukur diameter dari zone radikal.
- Zone Irradikal : suatu daerah disekitar disk menunjukkan pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibiotik tersebut, tetapi tidak dimatikan. Disini terlihat adanya pertumbuhan yang kurang subur dibandingkan dengan daerah luar pengaruh antibiotik tersebut.



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat-Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada saat penelitian ini adalah:

- Cawan petri
- Tabung reaksi
- Erlenmeyer
- Gelas ukur
- Mikro pipet
- Rak tabung reaksi
- Jarum ose
- Penjepit
- Bunsen
- Lemari pendingin
- Kompor
- Inkubator
- Autoclave
- Sentrifuge
- Timbangan sartorius
- Spektrofometer
- Water bath
- Camera digital

3.1.2 Bahan-Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada saat penelitian ini adalah:

- Biakan murni *V. alginolyticus*
- Biakan murni *V. Probioticus* AJ345063



- TSA (*Triptic Soya Agar*)
- TSB (*Triptic Soya Broth*)
- BHI (*Brain Heart Infusion*)
- TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bisesalt Sucrose Agar*)
- Aquadest
- Alkohol 70%
- Spirtus
- Kapas
- Filter mikro 0,2 μ l
- Alumunium foil
- Tissue
- Kertas label
- Mikrotip
- Eppendorf
- Falkon 15 cc
- Cetakan sumuran

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).

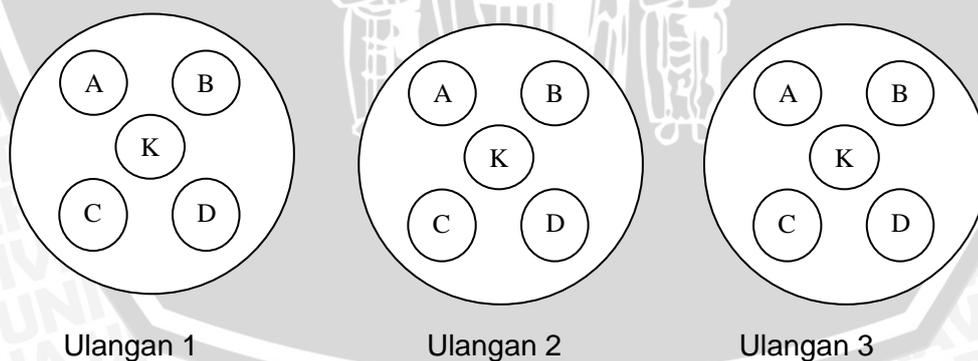
3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan program SPSS dengan metode one-way ANOVA atau analisis varian satu jalur digunakan untuk menguji perbedaan rata-rata antar dua atau lebih kelompok data yang independen. Asumsi dalam pengujian ANOVA adalah bahwa varian kelompok data adalah sama atau homogen (Priyatno, 2008).

Penelitian ini terdiri dari 4 perlakuan, 3 kali ulangan dan 1 kontrol. Sebagai perlakuan adalah pemberian supernatan *V. probioticus* AJ345063 dengan konsentrasi yang berbeda untuk mengetahui aktifitas daya hambat bakteri patogen. Adapun perlakuan tersebut adalah sebagai berikut:

- A = konsentrasi 12,5 %
- B = konsentrasi 25 %
- C = konsentrasi 50 %
- D = konsentrasi 100 %
- K = kontrol (tanpa perlakuan)

Jumlah sampel yang diamati adalah sebanyak 12 sampel. Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah percobaan seperti pada Gambar 1 berikut ini.



Gambar 1. Denah Percobaan

Keterangan:

A, B, C, D = perlakuan

K = kontrol

1,2,3 = ulangan

3.4 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 airkemudian tutup rapat.
- c. Autoclave ditaruh di atas kompor yang sudah dinyalakan, setelah beberapa saat manometer akan menunjukkan angka 1 atm dan suhu 121^oC. Keadaan ini dipertahankan selama 15 menit dengan mengatur kran pembuka dan penutupnya
- d. Kompor dimatikan dan tunggu 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 incubator sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

3.4.2 Pembuatan Media

a. TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bisesalt Sucrose Agar*)

- a. Media TCBSA ditimbang sebanyak 17,6 gram, kemudian dimasukkan pada erlenmeyer 250 ml
- b. Ditambahkan aquades sedikit demi sedikit hingga 200 ml
- c. Ditambahkan NaCl sebanyak 4 gram
- d. Dimasukkan dalam *waterbath* dengan suhu 100^oC hingga larut dan homogen selama 15 menit
- e. Media dituangkan pada cawan petri

- f. Dibiarkan hingga menjadi padat
- g. Disimpan pada inkubator selama 24 jam

b. BHI (*Brain Heart Infusion*) Broth

- a. Media BHI terdiri dari Calf Brain Infusion solids 12,5 gram, Beef Heart Infusions solids 5,0 gram, Protease Pepton 10 gram, Dextrose 2 gram, Sodium clorida 5 gram dan Disodium Phospate 2,5 gram
- b. Media BHI ditimbang sebanyak 37 gram
- c. Dimasukkan ke dalam erlenmeyer
- d. Ditambahkan aquades sedikit demi sedikit sebanyak 1000 ml sambil digoyang
- e. Erlenmeyer dimasukkan ke dalam *waterbath* dengan suhu 100°C selama 15 menit hingga terlarut sempurna
- f. Disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit
- g. Diinkubasi pada suhu 37°C

c. Preparasi Medium Sumuran

1. Medium Padat
 - a. 4 gram bubuk TSA ditimbang, dimasukkan ke dalam erlemeyer 250 ml
 - b. Ditambahkan aquadest 100 ml, digoyang-goyang hingga tercampur
 - c. Dipanaskan pada *waterbath* dengan suhu 100°C selama 15 menit dengan sesekali digoyang-goyang hingga larut sempurna
 - d. Disterilisasi pada autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit
 - e. Dinginkan sampai suhu 50°C
 - f. Dituangkan pada cawan petri steril masing-masing 20 ml
 - g. Didiamkan hingga dingin dan mengeras
 - h. Dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam untuk uji sterilitas
2. Media cair
 - a. 3 gram bubuk TSB ditimbang, dimasukkan ke dalam erlemeyer 250 ml

- b. Ditambahkan bacto agar 0,8 gram dan aquadest 100 ml, digoyang-goyang hingga tercampur
 - c. Diletakkan pada pH optimum agar bakteri uji dapat tumbuh
 - d. Dipanaskan pada water bath dengan suhu 100°C selama 15 menit, digoyang-goyang hingga larut sempurna
 - e. Dituangkan kedalam tabung reaksi masing-masing 10 ml, ditutup dengan kapas
 - f. Disterilisasi pada Autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit
 - g. Dinginkan hingga suhu 50°C, medium soft agar siap untuk digunakan
3. Pembuatan Medium Sumuran
- a. Alat sumuran ditancapkan pada medium Hard Agar
 - b. Ditambahkan suspensi bakteri OD : 0,1 sebanyak 0,1 ml
 - c. Dituangkan medium Soft Agar dengan suhu 50°C, goyang searah jarum jam
 - d. Dibiarkan hingga dingin dan memadat
 - e. Alat sumuran diambil
 - f. Medium siap untuk dipakai, dengan cara memasukkan kandidat antimikroba
- d. Pembuatan Supernatan *V. Probioticus* AJ345063**
- a. *Pancreatic digest of casein* ditimbang sebanyak 17 gram
 - b. *Papaic digest of soybean* meal ditimbang sebanyak 3 gram dicampur dengan 5 gram *Sodium chloride* dan 2,5 gram *Dibasic pottasium phospate*
 - c. Ditambahkan 1 liter aquades
 - d. Diinkubasi pada pH 7,3 dan disterilkan dengan suhu 121°C selama 15 menit
 - e. Disiapkan isolat *Vibrio sp* untuk dikultur pada medium tersebut pada suhu 30°C selama 48 jam
 - f. Disentrifugasi pada 10000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan supernatan

3.4.3 Persiapan Bakteri Uji

- a. **Pembiakan Bakteri *V. alginolyticus***

1. Disiapkan media TCBSA yang sudah dibuat
2. Digoreskan pada media TCBSA dari biakan murni menggunakan jarum ose yang sebelumnya dipanaskan pada bunsen
3. Cawan petri ditutup dan dipanaskan pada bunsen
4. Diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam

b. Pemiakan Bakteri *V. Probioticus* AJ345063

1. Disiapkan media BHI yang sudah dibuat
2. Dimasukkan pada media BHI dari biakan murni menggunakan jarum ose yang sebelumnya dipanaskan pada bunsen
3. Dikocok sampai rata
4. Diinkubasi pada suhu 37°C dengan posisi miring selama 48 jam

c. Pewarnaan Gram Bakteri *V. probioticus* AJ345063

1. Alkohol disemprotkan pada kaca objek. Kemudian dibersihkan dengan menggunakan tissue dan dibakar pada api bunsen
2. Dibakar jarum ose pada bunsen hingga berpijar dan didiamkan sebentar sampai dingin
3. Diambil biakan bakteri murni dengan menggunakan jarum ose dan diletakkan pada kaca objek
4. Dilakukan fiksasi sampel bakteri pada api bunsen dengan jarak 20 cm dari api
5. Ditambahkan pewarna kristal violet sebanyak satu tetes dan didiamkan selama 2 menit
6. Dicuci dengan air mengalir
7. Ditetaskan lugol pada gelas objek dan didiamkan selama 1 menit
8. Kemudian kaca objek dibilas dengan alkohol selama 30 detik dan dibilas dengan air mengalir
9. Ditambahkan pewarna safranin selama 15 detik dan dibilas kembali dengan air mengalir

10. Didiamkan dan dikeringkan untuk selanjutnya diamati pada mikroskop.

d. Kultur Preparasi Bakteri Uji dilakukan :

1. Bakteri uji diisolasi dari stock bakteri
2. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam
3. Diambil koloni terpisah 1-2 koloni, dimasukkan kedalam medium cair TSB
4. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam
5. Kultur bakteri yang telah tumbuh dispektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm, untuk mendapatkan OD :0,1
6. Disiapkan suspensi bakteri dengan OD : 0,1 untuk uji anti mikroba

3.4.4 Ujiantang bakteri *V. Probioticus* AJ345063 dengan *V. alginolyticus*

- a. Hasil isolasi bakteri *V. Probioticus* AJ345063 disentrifugasi sebesar 10000 rpm selama 15 menit untuk dijadikan supernatan
- b. Supernatan disaring dengan menggunakan filter mikro 0,2 μ kemudian supernatan diencerkan untuk menghasilkan dosis yang diinginkan (12,5%, 25%, 50%, 100%)
- c. Setelah diencerkan supernatan diambil dengan pipet mikro sebanyak 50 μ l dan masing-masing dimasukkan dalam lubang sumuran dengan diameter 6 mm.
- d. Hasil uji difusi sumuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- e. Kemudian diamati hasil dari ujiantang tersebut.

3.5 Parameter Uji

3.5.1 Parameter Utama

Parameter utama yaitu menggunakan parameter kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari pengukuran diameter hambatan *V. probioticus* AJ345063 terhadap aktivitas bakteri *V. Alginolyticus* pada masing-masing perlakuan yang terlihat di sekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong.

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 *V. alginolyticus* dan *V. probioticus* AJ345063

Dalam penelitian ini menggunakan bakteri *V. alginolyticus* yang didapatkan dari Balai Karantina Ikan Juanda, Surabaya, surat keterangan pembuktian disajikan pada lampiran 5. Sebelum digunakan dalam penelitian bakteri ini dikultur kembali pada media TCBSA (*Thiosulfat Citrat Bilesalt Sucrosa Agar*) dengan metode *streak* (gores). Dwiastuti (2001) dalam Sumargono (2004) menjelaskan bahwa TCBSA merupakan agar pepton dasar dengan perasan ragi, garam empedu, sitrat, sukrosa, ferrisitrat dan sodium thiosulfat. Bahan-bahan yang digunakan pada medium TCBSA ini mempunyai fungsi masing-masing seperti medium selektif lainnya, antara lain sebagai sumber karbon dan nitrat yang diperlukan untuk metabolisme kuman. Karbohidrat berupa sukrosa sebagai sumber energi. Bahan yang memperkaya adalah perasan ragi (untuk pertumbuhan). Sebagai inhibitor adalah garam empedu dan sodium sitrat yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan kuman yang tidak diharapkan. Biru timol brom sebagai indikator pH untuk mengukur perubahan pH pada media yang dihasilkan metabolisme kuman serta sebagai indikator pada proses fermentasi sukrosa. Indikator tercampur ion ferri untuk mendeteksi produksi H₂S serta bahan kimia dari campuran berbagai jenis, contohnya sodium thiosulfat untuk menyediakan sumber sulfur.

Bakteri *V. probioticus* AJ345063 dikultur kembali pada media BHI dengan menginokulasi biakan murni ke dalam tabung reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam. Morfologi bakteri *V. probioticus* AJ345063 diamati dengan teknik pewarnaan gram positif atau negatif. Hasil isolasi terhadap *V. probioticus* AJ345063 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. Menurut Pelezar dan Chan (1986), mekanisme pewarnaan gram didasarkan pada struktur dan komposisi dinding sel bakteri. Bakteri gram negatif mengandung lipid dalam persentase yang lebih tinggi daripada gram positif dan dinding sel bakteri gram negatif lebih tipis daripada dinding sel gram positif. Karena lipid pada bakteri gram negatif lebih tinggi, pada perlakuan etanol menyebabkan terekstraksinya lipid sehingga memperbesar daya rembes atau permeabilitas dinding selnya. Jadi kompleks ungu kristal-yodium (UK-Y) yang telah memasuki dinding sel dapat terekstraksi. Karena itu bakteri gram negatif kehilangan warna tersebut dan dapat menyerap warna tandingan. Karena kandungan lipidnya yang lebih rendah, dinding sel bakteri gram positif menjadi terdehidrasi selama perlakuan dengan etanol. Ukuran pori-pori mengecil, permeabilitasnya berkurang dan kompleks UK-Y tidak dapat terekstraksi. Jadi pada saat diberi pewarna tandingan, bakteri gram positif tidak dapat terwarnai.

Bakteri diamati dengan menggunakan mikroskop Olympus perbesaran 1000x setelah dilakukan pewarnaan gram yang ditunjukkan pada Gambar 2. berikut ini.



Gambar 2. Pewarnaan Bakteri *V. probioticus* AJ345063

Setelah didapatkan isolat bakteri uji maka dilakukan perbanyakan bakteri pada media cair menggunakan TSB (Tryticase Soya Broth). Media TSB untuk bakteri *V. probioticus* AJ345063 yang digunakan sebanyak 250 ml dengan jumlah bakteri 1-2 koloni. Kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 jam. Kultur bakteri yang telah tumbuh dispektrofotometer dengan panjang gelombang 625 untuk mendapatkan OD (Optical Density): 0,1. Sehingga suspensi bakteri dengan OD: 0,1 tersebut siap untuk digunakan sebagai bakteri uji antimikroba.

4.2 Supernatan *V. probioticus* AJ345063

Bakteri *V. probioticus* AJ345063 yang digunakan dalam penelitian ini dibuat menjadi supernatant dengan OD : 0,1 dan disentrifugasi pada 10000 rpm selama 15 menit sesuai dengan pernyataan ini sesuai dengan Albert *et al.*, (1991) bahwa untuk mendapatkan kekeruhan dengan standar Mc Farland 0,5 yaitu 10^8 diukur dengan panjang gelombang 625 nm. Pada penelitian ini, konsentrasi supernatan yang digunakan yaitu 0% (kontrol), 12,5%, 25%, 50% dan 100%. Penentuan konsentrasi tersebut berdasarkan penelitian kedua yang telah dilakukan dengan konsentrasi 12,5%, 25%, 37,5%, 50%, yang menunjukkan tidak berbeda nyata, sehingga diputuskan menggunakan penelitian pendahuluan. Sedangkan kepadatan bakteri uji yaitu *Vibrio alginolyticus* yang digunakan yaitu 10^8 sel/ml sesuai pernyataan 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 Hambat Supernatan *V. probioticus* AJ345063 Terhadap Aktifitas *Vibrio alginolyticus* Menggunakan Well diffusion (Difusi Sumuran)

Uji aktifitas penghambatan supernatant *V. probioticus* AJ345063 dengan *well diffusion* (metode sumuran) dapat dilihat pada Gambar 3 sebagai berikut.

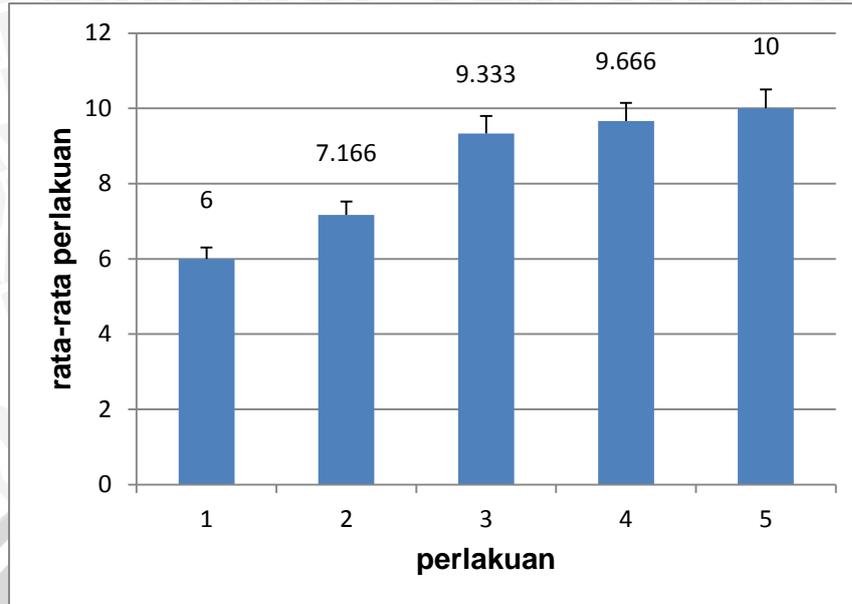


Gambar 3. Uji Difusi Sumuran (*well diffusion*) bakteri *Vibrio alginolyticus*

Gambar 3. dapat diketahui bahwa supernatant *V. probioticus* AJ345063 mampu menghambat aktifitas bakteri *V. alginolyticus*. Hal ini ditandai dengan terbentuknya daerah hambatan di sekitar lubang sumuran media bakteri, dimana daerah hambatan pada bagian tepi berwarna bening sedangkan pada daerah pusat berwarna kuning pucat. Didapatkan hasil penelitian yang dapat diketahui pada Tabel 1 dibawah ini.

Tabel 1. Hasil dan Rata-rata

KONSENTRASI (%)	ULANGAN (mm)			JUMLAH (mm)	RATA-RATA (mm)
	1	2	3		
0	6	6	6	18	6
12,5	6	7	8,5	21,5	7,166
25	9	9	10	28	9,333
50	9	9	11	29	9,667
100	9	10	11	30	10



Gambar 4. Diagram rata-rata diameter hambat *V. probioticus* AJ345063 terhadap *Vibrio alginolyticus*.

Dari hasil uji tantang di atas dapat diambil kesimpulan bahwa supernatant *V. probioticus* AJ345063 pada konsentrasi yang berbeda memberikan diameter hambat yang lebih besar jika dibandingkan dengan kontrol (0%). Sebaliknya semakin tinggi konsentrasi supernatant *V. probioticus* AJ345063 yang diberikan maka diameter hambat yang terbentuk semakin lebar. Hal ini disebabkan semakin tinggi konsentrasi dari perlakuan maka jumlah senyawa antibakterinya semakin banyak, seperti yang dikemukakan oleh Jawetz *et al.*, (1984) menjelaskan bahwa semakin tinggi konsentrasi antibakteri yang digunakan, maka kemampuan untuk membunuh bakteri semakin cepat.

Pengaruh supernatant *V. probioticus* AJ345063 pada konsentrasi yang berbeda terhadap aktifitas bakteri *Vibrio alginolyticus* dapat diketahui dengan melakukan analisa one way ANOVA. Hasil analisa one way ANOVA dapat dilihat pada Tabel. 2, 3, 4 di bawah ini. Tabel 3. Hasil Perhitungan metode ANOVA one way pada Pengaruh Perbedaan Pemberian Konsentrasi *V. probioticus* AJ345063 Sebagai Kandidat Probiotik Terhadap Aktivitas Bakteri *Vibrio alginolyticus* Secara Invitro”.

Tabel 2. Perhitungan rata-rata dan 95% selang kepercayaan

	N	Rata-Rata	Standar Deviasi	Standar Eror	Titik selang kepercayaan 95%		Minimal	maksimal
					Batas terendah	Batas tertinggi		
0	3	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
12,5	3	7.1667	1.25831	.72648	4.0409	10.2925	6.00	8.50
25	3	9.333	.57735	.33333	7.8991	10.7676	9.00	10.0
50	3	9.667	1.15470	.66667	6.7982	12.5351	9.00	11.0
100	3	10.000	1.00000	.57735	7.5159	12.4841	9.00	11.0
Total	15	8.633	1.80145	.46513	7.4357	9.4309	6.00	11.0

Tabel 3. Perhitungan lavene statistic

Levene statistic	df1	df2	sig.
2.263	4	10	.135

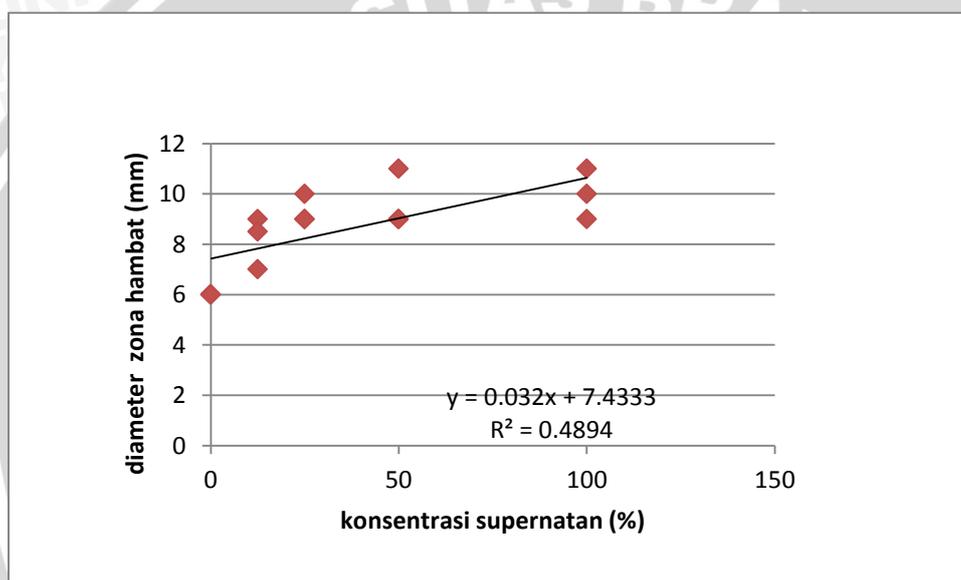
Tabel 4. Perhitungan hasil penelitian

	Jumlah kuadrat	Df	Rata-rata kuadrat	F	Sig.
Antar kelompok	36.933	4	9.233	10.863	.001
Dalam kelompok	8.500	10	.850		
Total	45.433	14			

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan metode ANNOVA one way Tabel 4. dapat diketahui bahwa pemberian supernatant *V. probioticus* AJ345063 dengan konsentrasi yang berbeda memberikan hasil berbeda nyata dalam menghambat aktifitas bakteri *V. probioticus* AJ345063 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%. Dalam uji ANOVA one way, uji tukey adalah uji pemilihan konsentrasi terbaik. Sesuai pada tabel 5, konsentrasi terbaik adalah 100% sesuai urutan pada tabel yang dibaca dari bawah keatas urutan yang terbaik sampai terendah.

Tabel 5. Hasil uji Tukey

Konsentrasi supernatant <i>V. probioticus</i> AJ345063	N	Subset for alpha = 0,05	
		1	2
0	3	6	
12,5	3	7,1667	
25	3		9,333
50	3		9,667
100	3		10,000



Gambar 5. Grafik Hubungan Konsentrasi Supernatant *V. probioticus* AJ345063 terhadap daya hambat *V. alginolyticus*

Dari data di atas hasil difusi sumuran diduga bakteri *V. probioticus* AJ345063 dapat menghambat aktifitas *V. alginolyticus* seperti yang dikatakan Isnansetyo (2005) bahwa interaksi mikroorganisme dengan mikroorganisme lain sangat kompleks dan salah satu hubungannya adalah sifat antagonism mikroorganisme terhadap pathogen tertentu. Mikroorganisme laut mampu menghasilkan metabolit sekunder dengan struktur kimia yang unik dengan fungsi ekologis untuk membantu agar organisme dapat mempertahankan diri.

Organisme patogen banyak ditemukan dari vertebrata dan invertebrata binatang laut (Pitogo, 1990;. Karunasagar et al, 1994;. Zhang & Austin, 2000; Alcaide, 2001 dalam Prashad, 2005).

Referensi pertama yang ditemukan adalah bakteriosin atau BLIS pada *V. harveyi* oleh McCall & Sizemore (1979), yang melaporkan produksi bakteriosin dalam suatu strain *Beneckeia harveyi* SY (*V. harveyi*). bakteriosin, "harveyicin SY", dengan estimasi massa molekul 24 kDa mampu mematikan bagi dua strain *V. harveyi*, KN96 dan BBP8. Selain itu, kerentanan SY harveyicin pada enzim proteolitik, dan gabungan plasmid (Hoyt & Sizemore, 1982 dalam Prashad et al., 2005), menjadikannya hanya definitif bakteriosin yang dilaporkan dari *V. harveyii* sampai saat ini.

Produksi bakteriosin dianggap sebagai salah satu sistem pertahanan yang ditampilkan oleh bakteri (Riley & Wertz, 2002 dalam Prashad et al., 2005), dan mungkin berfungsi untuk mediasi intra-spesifik atau interaksi di tingkat populasi (Riley, 1998 dalam Prashad, 2005), kemungkinan oleh persaingan antagonisme tetapi pada strain sensitif. (Hoyt & Sizemore, 1982 dalam Prashad et al., 2005) menunjukkan hal ini dominasi kompetitif dalam memproduksi bakteriosin strain *V. harveyii* SY pada pH 5.

Menurut Jha dan Zi-rong (2004) sebuah metabolit mikroba telah dikembangkan dengan anti-HIV reverse transcriptase potensi sebagai inhibitor terisolasi dari jaringan spons laut. Beberapa jenis *Vibrio* telah ditemukan menghasilkan berbagai ekstra seluler protease.

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).

4.4 Lingkungan Hidup Bakteri

Berdasarkan pengukuran pH, didapatkan nilai pH media sebesar 7. Kondisi ini baik untuk pertumbuhan bakteri. Disamping nutrisi yang memadai, sejumlah kondisi lain harus dipenuhi untuk menumbuhkan 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).

4.5 Suhu

Suhu yang diterapkan selama masa inkubasi dapat mempengaruhi laju pertumbuhan bakteri, karena mempengaruhi laju semua reaksi seluler. Suhu yang diukur pada penelitian adalah suhu inkubator. Pada saat penelitian, suhu inkubator yang digunakan sebesar 35°C. Bauman *et al.* (1984) dalam Prajitno (2008) menyatakan bahwa suhu optimum untuk pertumbuhan *Vibrio* berkisar antara 30 – 35°C sedangkan pada suhu 4°C dan 45°C bakteri tersebut tidak dapat tumbuh dan pada suhu 55°C akan mati. Dengan demikian suhu yang digunakan dalam penelitian masih berada dalam kisaran yang optimal untuk pertumbuhan bakteri.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian “Pengaruh Perbedaan Pemberian Konsentrasi Supernatan *V. probioticus* AJ345063 Terhadap Aktivitas Penghambatan *Vibrio alginolyticus* secara in vitro” dapat disimpulkan sebagai berikut:

- *V. probioticus* AJ345063 ternyata mampu menghambat aktifitas bakteri *Vibrio alginolyticus* dengan metode difusi sumuran.
- Rata-rata diameter hambatan pada bakteri *Vibrio alginolyticus* untuk perlakuan K (0%) adalah 6 mm, perlakuan A (12,5%) adalah 7,1667 mm, perlakuan B (25%) adalah 9,333 mm. perlakuan C (50%) adalah 9,667 mm dan perlakuan D (100%) adalah 10 mm, dari hasil tersebut didapatkan hasil yang berbeda nyata terhadap diameter hambat.
- Dari hasil penelitian didapatkan konsentrasi terbaik untuk menghambat aktifitas bakteri *V. alginolyticus* adalah 25%.
- Hubungan antara perbedaan konsentrasi supernatan *V. probioticus* AJ345063 terhadap aktifitas bakteri *V. alginolyticus* secara in vitro ditunjukkan dengan persamaan linier $y = 0,032x + 7,433$ dan $R^2 = 0,489$
- Nilai suhu dan pH yang stabil, sebagai parameter penunjang dapat mendukung penelitian ini.

4.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disarankan sebagai berikut :

- Perlu diadakan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh supernatant *Vibrio* sp. secara in vivo terhadap organisme air yang terserang bakteri *Vibrio alginolyticus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous a. 2010. Penyakit Dan Pengendalian Pada Ikan Mas dan Ikan Nila. <http://www.google-minahasautara.com>. Diakses 10 Desember 2008. Pukul 12.13 WIB.
- Albert, Balows, Hausler J. William., Hermann, Kenneth L, Isenberg Henry D., Shadomy H. Jean. 1991. Manual of Clinical Microbiology Fifth Edition. American Society for Microbiology. Washington DC.
- Austin, B, Stuckey . L. F., Robertson P. A. W., Effendi, T., Griffith D. R. W. 1995. A Probiotic Strain of *Vibrio Alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas Salmonicida*, *Vibrio Anguillarum* and *Vibrio Ordalli*. Departement of Biological Sciences, Heriot Walt University. Riccarton, Edinburgh, Scotland and *Especies de la Playa S. A. Playaes Pec Laboratorio de Camarones*, Guayaquil. Equador.
- Berek, Kristina Maria. 2010. Potensi Antagonistik *Crude Protein Vibrio alginolyticus* Terhadap *Vibrio Harveyi* secara *In Vitro*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Bonang, G. dan E.S. Koeswardono.1982. Mikrobiologi Kedokteran Untuk Lab dan Klinik. PT. Gramedia. Jakarta. 199 hal.
- Chan, K., M. L. Woo, L. Y. Lenn and G. L. French. 1989. *Vibrio parahaemolyticus* and Other Halopic *Vibrios* associated with seafood in Hongkong. *J. Appl. Bacteriol.* 66; 57-64.
- Dwidjosepoetro, D. 1989. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Penerbit Djambatan. Jakarta. 214 hal.
- Evelyn, T. P. T. 1984. Immunization. Against Pathogenic *Vibrio*. Symposium on Fish Vaccination. OIE. Paris 20-22 February 1984.

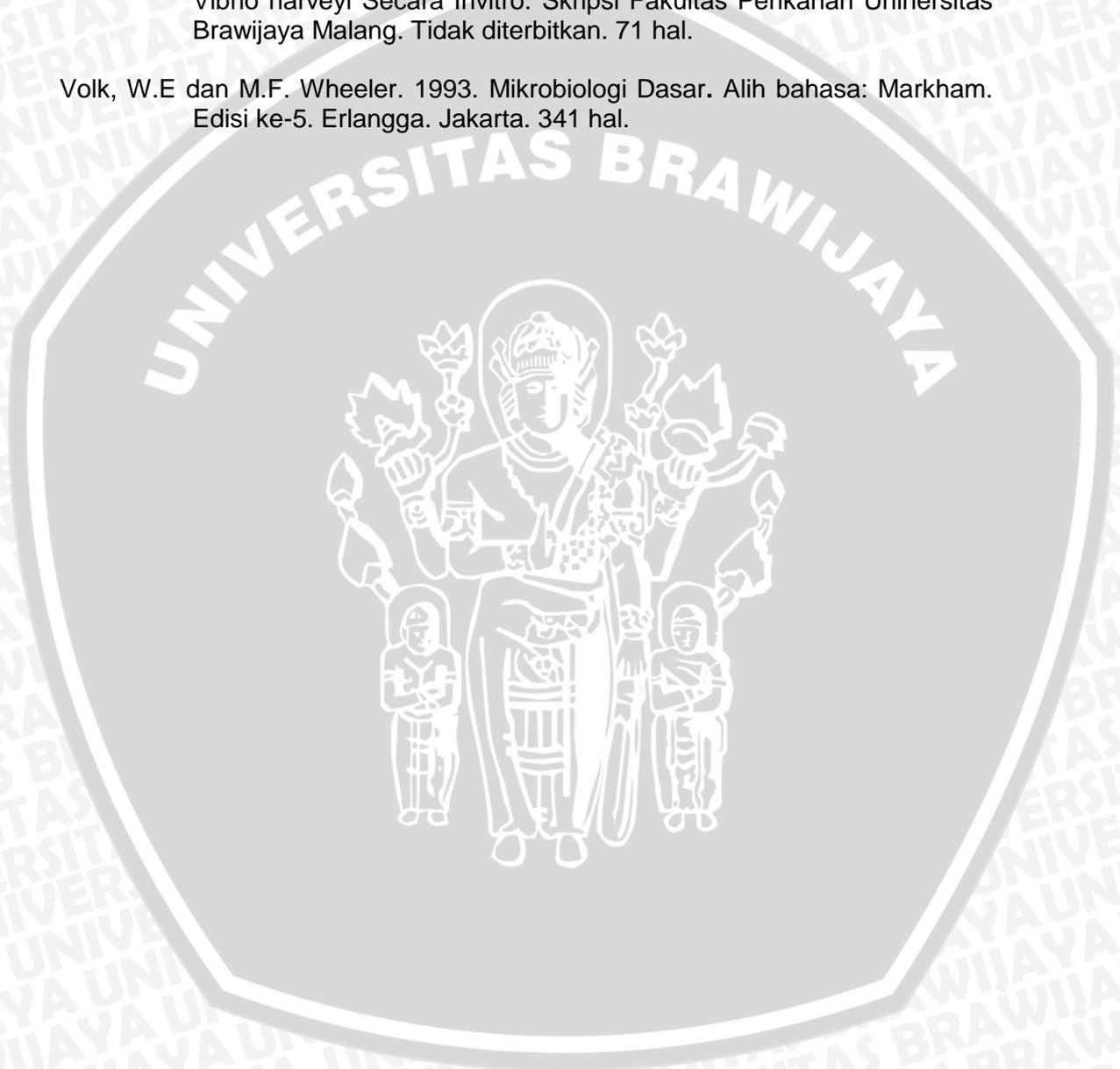
- Fadjar, M., Kilawati Y., Ni'matuzahro, Awaludin A., dan Kuhn H., 2009. Screening and 16S rDNA Identefication of *Vibrio harveyii's* Inhibitor Bacteria from Traditional Shrimp Ponds in Bangil, East Java, Indonesia. Usulan Naskah Artikel.
- Fahri, Muhammad. 2009. Bakteri Pathogen Pada Budidaya Perikanan *Vibrio Alginolyticus*. <http://www.google-blogger.com>. Diakses 1 Februari 2010. Pukul 11.37 WIB.
- Inglis, Valerie, Roberts J. Ronald, Bromage R. Niall. 2003. Bacterial Diseases of Fish. Institute of Aquaculture. University of Stirling.
- Irianto, Agus. 2005. *Patologi Ikan Teleostei*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Isnansetyo A. 2005. Bakteri Antagonis Sebagai Probiotik Untuk Pengendalian Hayati Pada Aquakultur. Jurnal Perikanan Laboratorium Hama dan Penyakit Ikan, Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian UGM. Yogyakarta.
- Jawetz, E., J.L. Manik dan E.A Edelberg. 1982. Mikrobiologi Untuk Profesi Kedokteran. CV. E.G.C. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 845 hal.
- Jha, Kumar Rajeev and Zi-rong Xu Dan. 2004. Biomedical Senyawa dari Organisme Kelautan. College of Animal Sciences. China.
- Kamiso, H. N. 1996. Vibriosis Pada Ikan dan Alternatif Cara Penanggulangannya. UGM J. Fish Sci.), 1 (1): 1-8.
- Kordi, M.G.H. 2004. *Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan*. PT Rineka Cipta dan PT Bina Adiaksara. Jakarta.
- Kusmiyati, N. W. S. dan Agustiyani. 2007. Uji Aktifitas Senyawa Antibakteri *Phorphindium quantum*. Biodiversitas 8(1). 48-53.
- Latif, Abdul. 2009. Bernegosiasi Dengan Bakteri. <http://www.google-infobiotekonline.com>. Diakses 12 Juli 2010. Pukul 14.30 WIB.
- Liston, J. and J. Baross. 1973. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the Natural Enviroment. J. Milk Food Technology, 36 ; 113-117.
- Maftuch. 2006. Karakteristik Protein Adhesin Omp *Vibrio Alginolyticus* dan Antibodi Hasil Induksinya serta pengaruhnya Terhadap Respon Imun Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Disrtasi. Program Doctor. Program Ilmu Kedokteran. Kekhususan Biomedik. Universitas Brawijaya. Malang.
- 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 Epthelial Resistance of Polarized T84 Intestinal Epthelial Cells. Infect Immune no. 68 vol. 11.

- Mulyadi, D., Subaidah, S., Harjono, S dan Fachrurozi. 2002. Pemberian Probiotik Pada Pemeliharaan Larva Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*). Laporan Hasil Perekayasaan. Balai Budidaya Air Payau Situbondo. 9 hal.
- Nicklin, J., Cook-Graeme K., Paget, T., Kilmington. 1999. Instant Notes in MICROBIOLOGY. Springer. United Kingdom.
- Noel, R., Krieg and John G. H. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol I. Williams and Wilkins. Baltimore USA. 964 p.
- Pelczar, M. J and Chan E. C. S. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi jilid I. Penerjemah: R.S Hadioetomo, Teja I, S. Sutarni, S.L Angka. Penerbit Universitas Indonesia Press. Jakarta. 502 hal.
- Pelezar, M.J., E.C.S. Chan. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi 1* . Universitas Indonesia. Jakarta.
- Pelezar, M. J. dan E.C.S. Chan. 2006. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Jilid 2. Ahli Bahasa: Hadioetomo, R.S., T. Imas, S. S. Trjitosomo dan S. Lestari. UI Press. Jakarta. 997 hal.
- Perikanan Unirow Tuban. 2010. Penggunaan Tehnologi Probiotik. <http://www.b1.blogger.com>. Diakses 5 November 2010. Pukul 16.42 WIB.
- 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. January 27-29. 2005. Patrajas Hotel. Semarang.
- Prajitno, A dan Marsoedi. 2007. Uji Sensitivitas Bio-aktif Alami Halimeda Opuntia Terhadap Bakteri *Vibrio Harveyi* secara in vitro (Uji Patogenitas Bakteri *Vibrio Haeveyi*).
- Prasad, Satish., Morris, C. Peter., Hansen, Rasmus., Meaden G. Philip, Austin, Bryan. 2005. A Novel Bacteriocin-like Subbstance (BLIS) from a Pathogenic Strain of *Vibrio harveyii*. Scholl of Life Sciences, Jhon Muir Building, Herriot-Watt University. UK.
- 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.
- Saz, A., V.S., Watson, S.R Brown, and D.L Lowery. (1963). Antimicrobial activity of marine waters.1.Macromolecular nature of *antistaphylococcal* factor. *Limnol.oceanogr*.8: 63-67.
- Simamarta, Tualar. 2006. Revitalisasi Ekosistem Tambak dengan Pemanfaatan Tehnologi Bioremediasi dan Probiotik, Makalah pada Seminar Tehnologi Bioremediasi dan Probiotik. 29-30 Maret 2006.

Sugita, H., Matsuo N., Hirose Y., Iwato M., Deguchi Y. 1997. *Vibrio* sp. Strain NM 10, Isolated from the Intestine of a Japanese Coastal Fish, Has an Inhibitory Effect against *Pasteurella piscicida*. Departement of Marine Science and Resource, Nihon University, Kameino Fujisawa, Kanagawa 252. Japan.

Sumargono. Pengaruh pemberian Perasan Jahe Merah (*Zingiber officinale*) dengan Konsentrasi yang Berbeda Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Vibrio harveyi* Secara Invitro. Skripsi Fakultas Perikanan Uninersitas Brawijaya Malang. Tidak diterbitkan. 71 hal.

Volk, W.E dan M.F. Wheeler. 1993. Mikrobiologi Dasar. Alih bahasa: Markham. Edisi ke-5. Erlangga. Jakarta. 341 hal.

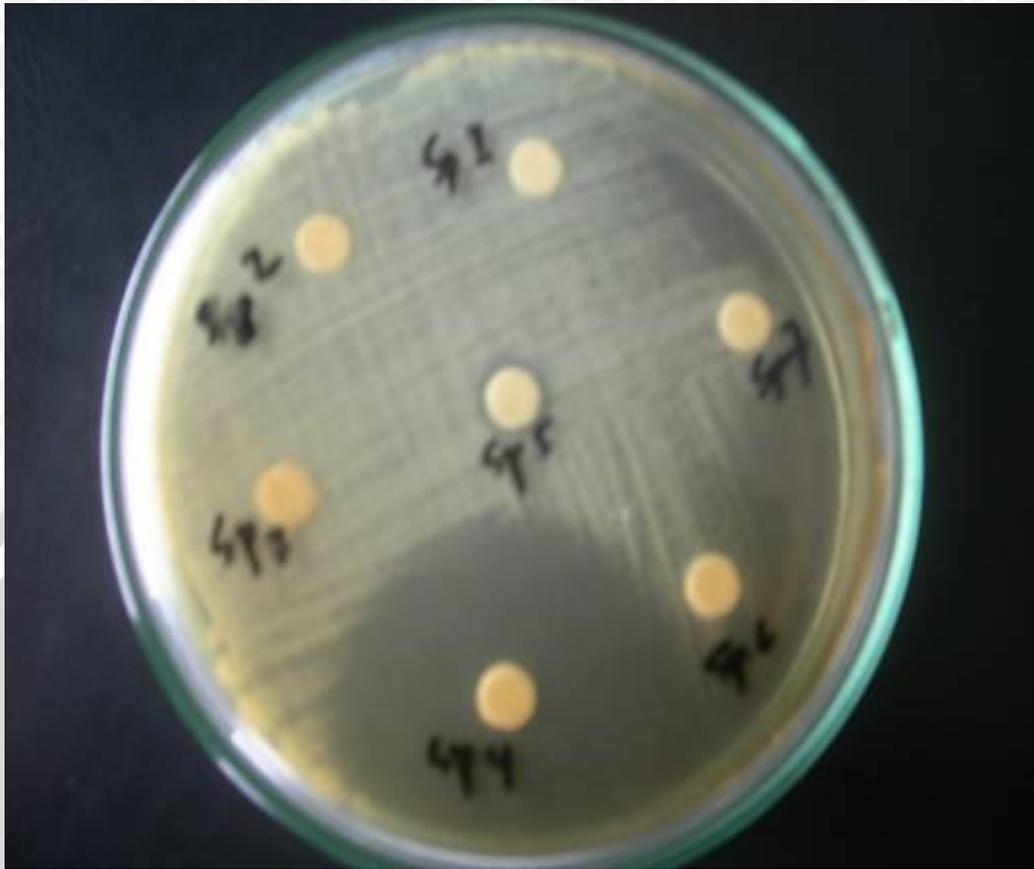


LAMPIRAN

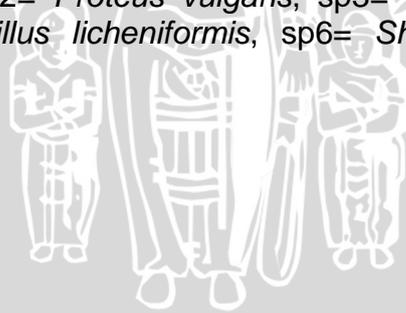
Lampiran 1. Hasil Identifikasi Bakteri

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

Lampiran 2. Hasil Uji Penghambatan dengan Uji Cakram



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



Lampiran 3. Susunan Sequencing

AJ345063 *Vibrio probioticus* partial 1 (1468 nt)
 initn: 3803 initl: 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)

```

x110-8                               10      20      30
                                CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATGCACAA
                                .....
EM_PRO ACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATGCACAA
      300      310      320      330      340      350

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

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

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

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

x110-8          280     290     300     310     320     330
GGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAG
.....
EM_PRO GGGCTCAACCTCGGAATGCAATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAG
      600     610     620     630     640     650

x110-8          340     350     360     370     380     390
AATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCCG
.....
EM_PRO AATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCCG
      660     670     680     690     700     710

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

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

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

x110-8          580     590     600     610     620     630
ATGAATTGACGGGGGCCGCAACGCGTGGAGCATGTGTTAATTCGATGCAACGCGA
.....

```



Lampiran 4. Perhitungan Pengenceran Konsentrasi Supernatant

Pengenceran Menggunakan Rumus : $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$

Keterangan : N_1 : Konsentrasi yang digunakan

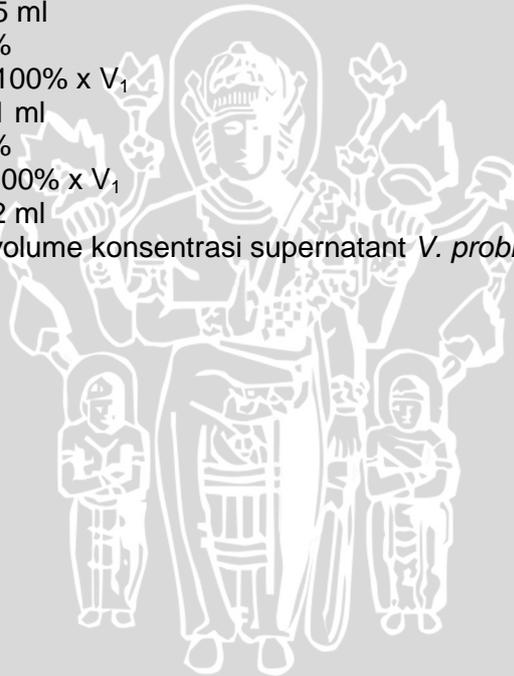
V_1 : Volume konsentrasi supernatant *V. probioticus* AJ345063 yang diperlukan

N_2 : Konsentrasi stok supernatant *V. probioticus* AJ345063 (100%)

V_2 : Volume yang digunakan (2 ml)

1. Konsentrasi 12,5%
 $12,5\% \times 2 \text{ ml} = 100\% \times V_1$
 $V_1 = 0,25 \text{ ml}$
2. Konsentrasi 25%
 $25\% \times 2 \text{ ml} = 100\% \times V_1$
 $V_1 = 0,5 \text{ ml}$
3. Konsentrasi 50%
 $37,5\% \times 2 \text{ ml} = 100\% \times V_1$
 $V_1 = 1 \text{ ml}$
4. Konsentrasi 100%
 $100\% \times 2 \text{ ml} = 100\% \times V_1$
 $V_1 = 2 \text{ ml}$

Volume NaCl = 2 ml – volume konsentrasi supernatant *V. probioticus* AJ345063



Lampiran 5. Surat Keterangan dari BKI Juanda



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



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

LAPORAN HASIL UJI

Report of Analysis

No.0135//BKIJ/IV/2010

KODE SAMPEL :0135
Sample Code
NAMA/JENIS SAMPEL :isolat
Type of Sample
NAMA PELANGGAN :Nesia
Customer
ALAMAT :Mahasiswa Unibraw Malang
Address
TANGGAL PENERIMAAN :01 April 2010
Received Date
TANGGAL ANALISA :01-04 April 2010
Date of Analysis
PARAMETER ANALISA :Identifikasi spesies Bakteri
Analysis of Parameters
SPESIFIKASI METODE :Konvensional
Method Specification
HASIL ANALISA :

NO	KODE SAMPEL	HASIL IDENTIFIKASI
	<i>Sample code</i>	<i>Result Identification</i>
1	0135	<i>Vibrio alginolyticus</i>

*Test Result***CATATAN***Note*

: Analisa dengan Metode Konvensional
Conventional method analysis



Surabaya, 21 Januari 2011

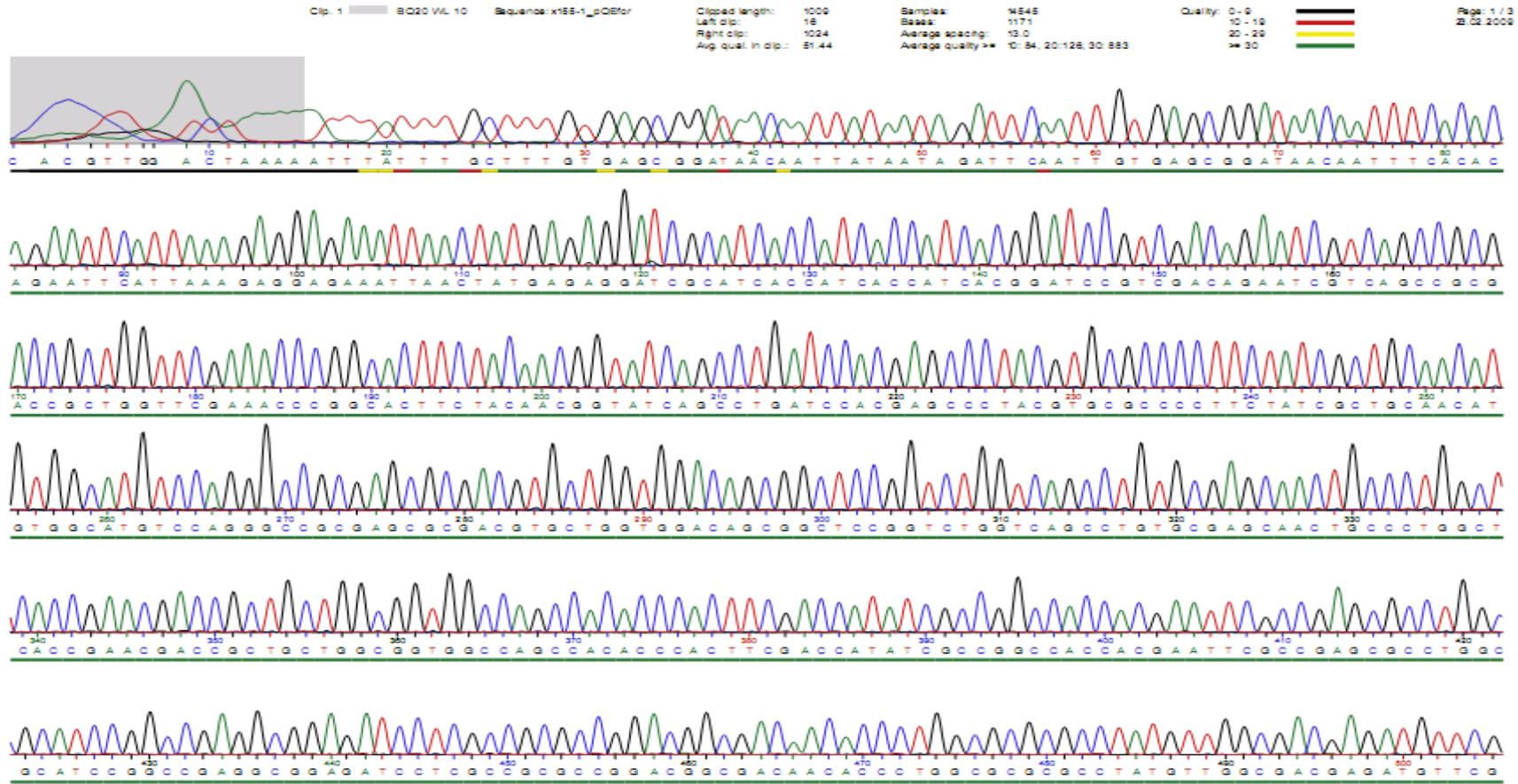
Peranggung jawab Lab BAKteriologi,

Lanjinem, S.Pi.MP

NIP. 19701206 199203 2 002



Lampiran 6. Hasil sequencing 16S rDNA



Lampiran 6. (lanjutan)

Clip: 1 BQ20 VL: 10 Sequence: x185-1_p0Efor Clipped length: 1000 Samples: 4545 Quality: 0-9
 Left clip: 18 Right clip: 1024 Bases: 1171 Average spacing: 13.0 10-19 20-29 30-39
 Avg. qual. in clip: 51.44 Average quality: 10: 84, 20: 128, 30: 883 30-39

