

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Sampel Ikankerapu

Ikan kerapu bebek yang dijadikan sampel berjumlah 10 ekor dengan 2 kali pengulangan.

Data ikan sampel seperti berat tubuh dan saluran pencernaan dapat dilihat dengan jelas pada tabel di bawah ini.

Tabel 1. Berat Total, Lambung dan Usus Ikan Sampel.

No	Sampel	Berat Total Sampel	Berat Lambung	Berat Usus
1	Sampel I	264 gram	6,5 gram	3,4 gram
2	Sampel II	242 gram	5,2 gram	2,3 gram
3	Sampel III	387 gram	6,7 gram	3,7 gram
4	Sampel IV	325 gram	3,8 gram	2,0 gram
5	Sampel V	376 gram	3,5 gram	3,1 gram
6	Sampel IV	420 gram	7,4 gram	3,7 gram
7	Sampel IIV	356 gram	6,5 gram	3,2 gram
8	SampelVIII	380 gram	6,6 gram	3,8 gram
9	Sampel IX	430 gram	8,3 gram	4,1 gra,
10	Sampel X	440 gram	8,1 gram	3,8 gram

5.2 Identifikasi Morfologi dan Biokimia Bakteri Probiotik

Identifikasi dilakukan dengan mengamati secara langsung terhadap koloni yang tumbuh yang diinkubasi pada suhu pertumbuhan optimum 37 °C selama 24-48 jam. Masing-masing koloni yang tumbuh memiliki perbedaan baik warna, bentuk maupun bentuk tepian. Dari hasil yang diperoleh dari pengamatan didapatkan bentuk koloni tidak beraturan dengan bentuk pinggiran juga tidak teratur, bundar dengan pinggiran tidak teratur, bundar pinggiran berombak, bundar dengan pinggiran berlekuk, bundar dengan pinggiran seperti wolff dan bundar dengan pinggiran licin. Warna koloni yang terlihat

pada media agar berwarna krem, putih keruh, kuning muda, kuning pucat dan coklat muda.

Hasil pengamatan terhadap koloni dan sel bakteri tersebut sesuai dengan yang dikemukakan oleh Hadioetomo (1993) bahwa bentuk koloni dapat dilukiskan bundar dengan tepian berkarang, bundar dengan tepian timbul, bundar dengan tepian menyabar, keriput, rizoid, filiform sedangkan tepian koloni dapat berbentuk licin, berombak, berlekuk, tidak beraturan, bercabang dan sebagainya.

Bentuk sel bakteri dari isolat yang ditemukan berbentuk batang (basil) dan bulat (kokus). Tipe pergandengan sel bakteri yang ditemukan adalah berpasangan (diplo), rantai (strepto) dan tunggal (mono). Menurut Volk dan Wheeler (1993) bahwa umumnya bentuk sel bakteri dapat dibedakan atas tiga kelompok utama yaitu bulat (*coccus*), batang (*Bacill*) dan spiral. Tipe pergandengan sel bakteri ada berpasangan, berbentuk rantai dan membentuk pola tidak beraturan. Hadioetomo (1993) menambahkan bentuk sel bakteri dapat dibedakan atas tiga kelompok bulat (*coccus*), batang (*Bacill*) dan spiral dengan tipe pergandengan tunggal, berpasangan, berbentuk rantai, bergerombol, berkelompok empat (tetrad), bentuk kubus, bentuk paggar dan membentuk pola tidak teratur seperti bentuk V, X dan Y.

Bakteri probiotik yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan kerapu bebek hasilnya didapatkan enam isolat yang mampu hidup baik pada pH 2 yaitu: Bpa, Bpb, Bpc, Bpd, Bpe dan Bpf. Dari hasil isolasi dan identifikasi bakteri diketahui bahwa pada umumnya bakteri berbentuk batang dan bulat. Dari hasil uji pewarnaan Gram diketahui semua isolat bersifat positif. Hal serupa dengan uji katalase semua isolat bersifat positif. Pada uji oksidase yang dilakukan semua isolat bersifat negatif.

Hasil penelitian berdasarkan morfologi dan sifat biokimia bakteri ditemukan, terdapat perbedaan satu dengan yang lainnya seperti yang terdapat pada tabel 2.

Tabel 2. Morfologi dan Sifat Biokimia Isolat Bakteri Probiotik

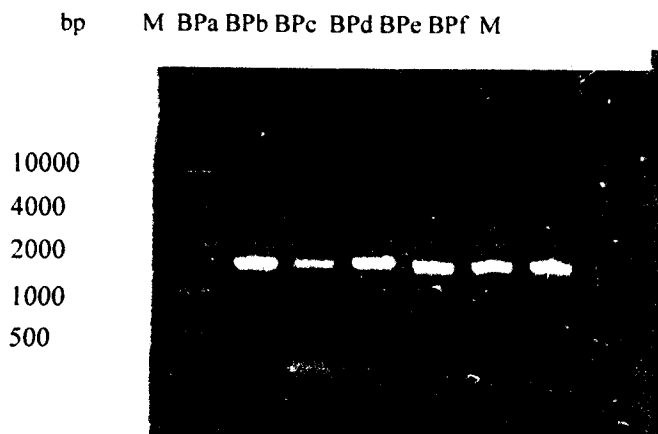
ISOLAT	LproA	LproB	LproC	LproD	LproE	LproF	LproG
Bentuk Koloni	Tidak Beraturan	Bundar	Bundar	Bundar	Tidak beraturan	Bundar	Bundar
Warna	Krem	Krem	Kuning Muda	Keputihan	Krem	Krem	Kuning Pucat
Bentuk Tepian	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Berlekuk	Wolf	Berlekuk	Berobak	Berombak
Pewarnaan	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+	+	+
Oksidase	-	-	-	-	-	-	-
Motilasi	+	+	+	+	+	+	-
Metil red	-	-	-	+	-	-	-
Holofilik							
1 %	Baik	Sangat baik	Baik	Baik	Baik	Sangat Baik	Sangat Baik
3 %	Baik	Baik	Baik	Baik	Sangat Baik	Baik	Baik
7 %	Kurang Baik	Baik	Baik	Baik	Baik	Baik	Baik
Kemampuan uhu Berbeda							
0-5 ⁰ c	Tidak Baik	Tidak Baik	Tidak Baik	Tidak Baik	Tidak Baik	Tidak Baik	Tidak Baik
15- 25 ⁰ c	Baik	Baik	Baik	Baik	Baik	Baik	Baik
30-37 ⁰ c	Sangat baik	Sangat Baik	Sangat Baik	Sangat Baik	Sangat Baik	Sangat Baik	Sangat Baik
Bentuk Sel	Batang / Basil	Bulat / Kokus	Bulat / Kokus	Batang / Basil	Bulat / Kokus	Batang / Basil	Batang / Basil
Bergandengan	Berpasangan	Berpasangan	Berpasangan	Rantai	Berpasangan	Berpasangan	berpasangan

5.2 Amplifikasi DNA

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, diperoleh bahwa bakteri yang diisolasi dari usus dan lambung ikan kerapu bebek dapat tumbuh dan berkembang pada media kultur TSA dengan pH 2, yang merupakan indikator utama bakteri probiotik. Koloni bakteri yang tumbuh pada media terdapat dalam berbagai macam bentuk, warna, tepian, ukuran, dan permukaan koloni (elevasi) yang berbeda. Dari hasil pengamatan morfologi ditemukan 6 isolat bakteri pada saluran pencernaan ikan kerapu macan yaitu

BPa, BPb, BPc, BPe, dan BPe. Masing-masing isolat memiliki morfologi yang berbeda satu sama lain.

Hasil amplifikasi DNA PCR universal dari ke-6 isolat bakteri dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA-PCR universal pada gel agarose. Semua band berada di posisi 1500 bp, karena primer yang dipakai untuk PCR 16S universal (targetnya 1500 bp).

Keterangan:

M	=	Primer I. 27 F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)
BPa	=	Bakteri Probiotik a
BPb	=	Bakteri Probiotik b
BPc	=	Bakteri Probiotik c
BPd	=	Bakteri Probiotik d
BPe	=	Bakteri Probiotik e
BPf	=	Bakteri Probiotik f
M	=	Primer II.1492 R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT)

Gambar 1 menunjukkan bahwa semua isolat menghasilkan pita tunggal dengan ukuran sekitar 1500 bp (*base pair*) sesuai dengan perbandingan menggunakan marker DNA. Besarnya ukuran ini sesuai dengan ukuran yang diharapkan dari gen-gen 16S *rDNA* bakteri yaitu 1500-1600 bp.

5.3 Sekuensing DNA Isolat Bakteri

Sekuensing adalah proses pengurutan basa nitrogen dengan menggunakan basa nitrogen dengan menggunakan mesin sekuencer. Hasil sekuensing 16S *rDNA* dari masing-masing isolat bakteri dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3 Hasil sekuensing gen 16S rDNA dari isolat bakteri.

No	Isolat	sekuen gen 16S rDNA
1.	BPa	GCTTTGGACCCCAAAAAGGGGGTGGAAAGAAACCTCGCCTGGAA GACTCGGGGTAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTT GTITGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACC ACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA CGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCT GTITGTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTT GACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAG TGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAAATG CGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG GTCTGTAAGTACGCTGAGGAGACGAAAAGCGTGGGGGAGCGA ACAAGGTTTTGATACCCCGGGTGGT
2.	BPb	ACTGCCCTGTTCCGAGGCAGGCGGACGGGTGGAGTAATGGCCTA GGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCT AATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGC CTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGA GGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG ATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACG GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGA TGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG CACTTTCAAGTCGTGAGGAAGGTGGTAGAGTTAATAGCTCCATTA TTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACT GGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTTAA

3.	BPc	CATTTTACGGGGGGGGGCCGATCCACGCACGTGAGCGAATGGA TAAGAGCTTGGTCTTATGAAGTTAGGGGCCTTACGGGAGAGTTA ACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC GGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATT GAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCA TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGT AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG CITTCGGGTACGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTA GTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAAGAAAGCCAC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAG CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTC TTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT TGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTC CATGTGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACA
4.	BPd	ACAACCTTACGCCCCAACGTCCGGAGCGGGAAACAAGTGATCTGA ACCTTCGGGGAAACGATAACGGCGTCGAGCGGGCGGACGGGTGAG TAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCAATTGGAA ACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGG ACCTTCGGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGC TAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTG GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCA GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC GCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCG GGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGGAGTTAAT AGCTCTATTATTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAAC TCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAAT CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTC AGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTTGAAAC TGGCAGACTAGATACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTAGGTGTA CGGTGAAATGCGTATAGATCTTCAGGGAATACTGGTGG
5.	BPe	TTCCGGAAGCCGGACACGATGTGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACT GGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTG AACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGGGGCTTCGGCTACCACTTA CGGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT CACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC CACTAGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTT AGGGAAGGACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTTCTTGACGGT ACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCTACCGCGG TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA GGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGC TCACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGAAGTTGTGTGCAGA AGAGGAGAGTGGAATTCTCTCCG

6.	BPf	GCAATTGGGAGCATCGATGTCCGCGCGACGGAGGAGCAACACG GGGGCAACCGGCTGTAAACGGGGAGAACTCCGGGAAACCGG AGGTAATCCCGGATAACATTTTCTCTTGGATAACAGAAAATTGA AGGATGGCTTCGGCTATCACTTACAGATGGGTCCCCGGGGCATT ATCTCGTTGGGGAGGTAACGGGTCTCCAAAAGGACAATGCATAG CCGACGTGAGAGGGGGAGCTCCCACACTGTGACTCAGACACGCC CCACACTCCTCCACGAGGCACCACTAGGGAATCTTCCGCAATGG ACGAAAGTCTGACATAACCACCGCCCCGTGTGTGATAAAGGCTTT CGGGGCGTAAACTCTGTTGTTAGCGAAGAACAGGTACAAGAGT TACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTA TCCTGAATTATTGGGGGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCT
----	-----	---

5.4 Analisis Sekuen DNA Isolat Bakteri

Hasil penelusuran sekuen masing-masing isolat bakteri dengan sistem BLAST dapat dilihat pada tabel 4. Sedangkan homologi sekuen 16S rDNA isolat bakteri dapat dilihat pada lampiran .

Tabel 4. Hasil penelusuran sekuen 16S rDNA isolat bakteri dengan sistem BLAST.

No	Isolat	Hasil Sekuensing	Homologi (%)	No. Akses
1.	BPa	<i>Bacillus velesensis</i> strain CR-11	99	AY605932
2.	BPb	<i>Vibrio alginolyticus</i> A3G-2	98	DQ995519
3.	BPc	<i>cereus</i> site2S	98	DQ420176
4.	BPd	Uncultured bacterium clone BB3S16S-17	99	EF089472
		<i>Bacillus subtilis</i> strain CICC10066		
5.	BPe	<i>Bacillus flexus</i> strain LF-3	98	DQ055131
6.	BPf		98	EF127831

Bakteri probiotik adalah bakteri hidup yang diberikan sebagai suplemen makanan yang mempunyai pengaruh yang menguntungkan pada kesehatan baik pada manusia maupun hewan, dengan memperbaiki keseimbangan mikroflora intestinal. Bakteri-bakteri non patogen (probiotik) yang berdomisili di usus terutama usus besar dan mengadakan kolonisasi yang membentuk mikroekosistem yang bermanfaat untuk kesehatan dalam aspek ketahanan infeksi, aspek metabolik dan aspek imunologis.

Dari identifikasi molekuler, bakteri yang terdapat pada saluran pencernaan kerapu bebek didominasi oleh bakteri dari genus *Bacillus* dan diikuti oleh *Vibrio*. Bakteri dari genus *Bacillus* merupakan bakteri probiotik yang sudah banyak dikomersilkan. Irianto (2003) menyatakan bahwa *Bacillus sp* merupakan bakteri probiotik komersil yang dapat ditebar pada kolam atau tambak. Bakteri ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti bakteri *Vibrio harveyi* yang berada di perairan. Selanjutnya dikatakan bahwa tidak semua dari genus *vibrio* merupakan bakteri patogen, seperti *Vibrio*

alginoliticus merupakan bakteri probiotik yang banyak terdapat pada air laut. Bakteri ini dapat hidup pada saluran pencernaan ikan selama 21 hari pada suhu 15 °C. Bakteri ini juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio ordalii* dan *Vibrio anguillarum*.

Dari tabel homologi sekuen 16 S rDNA dari masing-masing isolat bakteri dengan sekuen 16 S rDNA dari data base bank diketahui bahwa tidak ada sekuen 16 S rDNA isolat bakteri yang indentik. Hagstrom *et al.* (2000) menyatakan bahwa isolat yang mempunyai persamaan sekuen 16 S rDNA lebih dari 97 % dapat mewakili spesies yang sama. Sedangkan persamaan sekuen antara 93 % -97% dapat mewakili identitas pada tingkat genus tetapi berbeda pada tingkat spesies.

Dari pernyataan tersebut dapat dikatakan bahwa isolat BPa mempunyai kekerabatan dengan *Bacillus velesensis* strain CR-11 pada tingkat spesies karena mempunyai persamaan sekuen 99 % sebanyak 638 spesies dari 642 spesies yang telah ditemukan. Isolat BPb mempunyai tingkat kekerabatan spesies dengan *Vibrio alginolyticus* A3G-2 dengan persamaan sekuen 98 % sebanyak 643 spesies dari 652 spesies yang telah ditemukan, isolat BPc mempunyai tingkat kekerabatan spesies dengan *Bacillus cereus* site2S dengan persamaan sekuen 98 % sebanyak 658 spesies dari 668 spesies yang telah ditemukan, isolat BPd mempunyai tingkat kekerabatan spesies dengan Uncultured bacterium clone BB3S16S-17 dengan persamaan sekuen 99 % sebanyak 636 spesies dari 641 spesies yang telah ditemukan, isolat BPe mempunyai tingkat kekerabatan spesies dengan *Bacillus subtilis* strain CICC10066 dengan persamaan sekuen 98 % sebanyak 595 spesies dari 605 spesies yang telah ditemukan, dan isolat BPf mempunyai tingkat kekerabatan spesies dengan *Bacillus flexus* strain LF-3 dengan persamaan sekuen 98 % sebanyak 432 spesies dari 485 spesies yang telah ditemukan.

Hasil analisis fragmen DNA hasil amplifikasi PCR menunjukkan bahwa terdapat empat isolat yang mempunyai kekerabatan dekat, yaitu isolat BPa, isolat BPc, isolat BPe, dan isolat BPf yang menunjukkan persamaan pada tingkat genus yaitu *Bacillus*. Sedangkan isolat BPb menunjukkan persamaan pada tingkat genus *Vibrio*.

Setiap spesies bakteri memiliki ciri-ciri molekuler yang dapat membedakannya dari satu spesies dengan spesies yang lain dalam satu genus. Bakteri *Bacillus velesensis* strain CR-11 memiliki ciri-ciri molekuler yaitu terdiri atas 721 pasang basa nitrogen, bakteri *Vibrio alginolyticus* A3G-2 terdiri atas 514 pasang basa nitrogen, bakteri *Bacillus*

cereus site2S terdiri atas 694 pasang basa nitrogen, Uncultured bacterium clone BB3S16S-17 terdiri atas 694 pasang basa nitrogen, bakteri *Bacillus subtilis* strain CICC10066 terdiri atas 631 pasang basa nitrogen, dan bakteri *Bacillus flexus* strain LF-3 terdiri dari 514 pasang basa nitrogen. Ini dapat dilihat dari elektroperogram hasil sekuen mesin squencer menggunakan Bigdye V. 3.1.