



# Jurnal Sains Akuakultur Tropis

## Departemen Akuakultur

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan - Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang, Semarang 50275

Telp. (024) 7474698, Fax.: (024) 7474698

Email: [sainsakuakulturtropis@gmail.com](mailto:sainsakuakulturtropis@gmail.com), [sainsakuakulturtropis@undip.ac.id](mailto:sainsakuakulturtropis@undip.ac.id)

### PENAMBAHAN KANDIDAT PROBIOTIK *Bacillus methylothrophicus* SECARA BERKALA PADA MEDIA PEMELIHARAAN UNTUK PENCEGAHAN INFEKSI BAKTERI *Aeromonas hydrophila* PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)

*Addition of Bacillus methylothrophicus Probiotic Candidate Periodically in Media Culture for The Prevention of Bacterial Infection Aeromonas hydrophila in Tilapia Fish (Oreochromis niloticus)*

Femy Musthofa Ardy, Desrina\*, A.H. Condro Haditomo

Departemen Akuakultur,

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,

Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah -50275, Telp/Fax. +62247474698

\* Corresponding author: [rinadesrina@yahoo.com](mailto:rinadesrina@yahoo.com)

#### ABSTRAK

*Aeromonas hydrophila* adalah bakteri yang menyebabkan penyakit MAS (*motile aeromonas septicemia*) pada budidaya ikan tawar dan dapat menyebabkan kematian massal dalam waktu cukup singkat pada beberapa spesies termasuk ikan nila. Terdapat beberapa strategi alternatif dalam pencegahan, salah satunya penggunaan bakteri probiotik sebagai agen pengontrol atau pencegahan penyakit ini. Salah satu kandidat probiotik yang telah diidentifikasi secara molekular 16sRNA dan diketahui memiliki kemampuan menghambat bakteri patogen adalah *B. methylothrophicus*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji *B. methylothrophicus* dalam menghambat *A. hydrophila* pada budidaya *Oreochromis niloticus*. Penelitian ini terdiri dari uji *in vitro* dan *in vivo* yang menggunakan metode eksperimen rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan (kepadatan 1 ikan/l) dan 3 ulangan. Perlakuan terdiri dari campuran *A. hydrophila*  $10^2$  CFU/mL dengan bakteri *B. methylothrophicus*  $10^9$  CFU/mL (a) Tanpa penambahan *B. methylothrophicus* (b) Penambahan setiap 3 hari, (c) Penambahan setiap 5 hari, (d) Penambahan setiap 7 hari. 120 ikan dengan berat rata-rata  $17,5 \pm 1,9$  g digunakan sebagai hewan uji. Berdasarkan uji *in vitro*, konsentrasi *B. methylothrophicus* yang paling kuat untuk menghambat *A. hydrophila* adalah  $10^9$  cfu/mL dengan zona bening  $24,9 \pm 4,2$  mm. Uji *in vivo* menunjukkan bahwa penambahan *B. methylothrophicus* secara berkala tidak berpengaruh nyata terhadap tingkat kelangsungan hidup, akan tetapi dapat memperlambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Perlakuan D menunjukkan tingkat kelangsungan hidup tertinggi (13,33%), diikuti oleh perlakuan A (6,66%), B (3,33%), dan C (3,33%). Hasil ini menunjukkan bahwa *B. methylothrophicus* dapat memperlambat pertumbuhan *A. hydrophila* secara *in vitro*, dan mampu meningkatkan SR sebesar 6,66% pada uji *in vivo*.

**Kata kunci:** *B. methylothrophicus*, kandidat probiotik, *A. hydrophila*, *O. niloticus*, ikan nila

#### ABSTRACT

*Aeromonas hydrophila* is a bacteria that causes of MAS disease (*motile aeromonad septicemia*) in freshwater fish cultivation and can cause mass death in a fairly short period of time in some species including tilapia. There are several alternative strategies in prevention, one of which is the use of probiotic bacteria as agents for controlling or preventing this disease. One candidate for probiotics that has been molecularly identified as 16sRNA and is known to have the ability to inhibit pathogenic bacteria is *B. methylothrophicus*. The aim of this research was to study *B. methylothrophicus* in inhibiting *A. hydrophila* in *Oreochromis niloticus* culture. This research consisted of *in vitro* and *in vivo* test that used experiment method with completely randomized design with 4 treatments (density of 1 fishes/l) and 3 replications. The treatment consisted of a mixture of *A. hydrophila*  $10^2$  CFU/mL with *B. methylothrophicus*  $10^9$  CFU/mL (a) without addition of *B. methylothrophicus* (b) Addition every 3 days, (c) Addition every 5 days, (d) Addition every 7 day. 120 fishes at average weight of  $17,5 \pm 1,9$  g was used as experimental animals. Based on the *in vitro* test, the most powerful concentration of *B. methylothrophicus* to

inhibit *A. hydrophila* was  $10^9$  cfu/mL with clear zone of  $24,9 \pm 4,2$  mm. In vivo tests show that the addition of *B. methylotrophicus* periodically does not significantly affect survival rates, but can slow the growth of *A. hydrophila*. Treatment D showed the highest survival rate (13.33%), followed by treatment A (6.66%), B (3.33%), and C (3.33%). These results indicate that *B. methylotrophicus* can prevent the growth of *A. hydrophila* in vitro, and can increase SR by 6.66% in the in vivo test.

**Keywords:** *B. methylotrophicus*, probiotic candidate, *A. hydrophila*, *O. niloticus*, survival rate

Article Received: 20-12-2018; Accepted: 09-09-2019

## PENDAHULUAN

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan jenis ikan budidaya air tawar yang memiliki nilai ekonomis penting dan merupakan salah satu jenis ikan yang populer di konsumsi di kalangan masyarakat Indonesia. Nilai produksi ikan nila terus meningkat pada tahun 2010 sebesar 491.800 ton dan pada tahun 2012 meningkat sebesar 850.000 ton (KKP, 2013). Dengan semakin meningkatnya komersialisasi dan intensifikasi produksi akuakultur, penyakit dan kerusakan kondisi lingkungan adalah masalah utama pada kegiatan budidaya ikan nila (Das *et al.*, 2017) dan berdampak pada kerugian ekonomi. Salah satu jenis penyakit ikan yang sering dijumpai pada ikan nila dan ikan air tawar pada umumnya di seluruh dunia adalah penyakit *bacterial* yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Bakteri *A. hydrophila* adalah bakteri bersifat oportunistik yakni mampu menimbulkan penyakit apabila ada faktor lain yang mendukung dan dapat menyebabkan kematian pada ikan dalam waktu yang singkat (Garde *et al.*, 2010). *A. hydrophila* merupakan agensia penyebab penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) yang memiliki tanda-tanda berupa terjadinya hemoragi meluas pada permukaan tubuh, pangkal sirip ekor dan *operculum*,

Berbagai upaya telah banyak dilakukan untuk menanggulangi infeksi *A. hydrophila*, salah satunya dengan pengobatan menggunakan antibiotik yang sebenarnya dapat membuat bakteri patogen menjadi resisten dan residu pada ikan yang akan berbahaya apabila dikonsumsi manusia. Solusi lain yang dapat digunakan yakni penggunaan bakteri probiotik dan merupakan salah satu pendekatan alternatif yang lebih aman dibandingkan dengan antibiotik atau bahan kimia lain untuk pengendalian pencegahan terjadinya penyakit dalam kegiatan budidaya (Esteban *et al.*, 2014). Bakteri kandidat probiotik yang berpotensi menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* adalah bakteri *Bacillus methylotrophicus* yang ditemukan oleh Haditomo *et al.* (2017), dengan kode isolat CBL20. *B. methylotrophicus* mampu secara aktif menghambat bakteri patogen baik Gram positif, maupun Gram negatif (Sharma *et al.*, 2013). Kandungan lipopeptida siklik yang termasuk dalam kelompok surfaktan dan iturin diduga menjadi zat aktif yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Jemil *et al.*, 2017). Potensi *B. methylotrophicus* ini masih belum banyak diterapkan pada bakteri patogen ikan, termasuk *A. hydrophila* pada ikan nila.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh penggunaan bakteri kandidat probiotik dalam media budidaya terhadap gejala klinis, kelulushidupan ikan nila (*O. niloticus*), dan fluktuasi kepadatan bakteri dalam air budidaya ikan nila (*O. niloticus*) yang diberi *A. hydrophila* serta untuk mengetahui waktu pemberian terbaik *B. methylotrophicus* secara *in vitro* dan *in vivo* dalam menghambat *A. hydrophila* pada media budidaya ikan nila. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Juli 2018 di Laboratorium Kering dan Basah Departemen Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro, Semarang.

## MATERI DAN METODE

Ikan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan nila (*O. niloticus*) yang berasal dari Unit Pembenhian Rakyat Mina Muncul (Muncul, Ambarawa, Semarang) dengan padat tebar 1 ekor/L, 10 ekor/akuarium, total ikan 120 ekor dengan rata-rata bobot  $17,5 \pm 1,9$  g. Pakan yang digunakan adalah pakan komersil berbentuk pelet dengan kadar protein 35% diberikan secara *at satiation* sebanyak 2 kali (pagi dan sore hari) yaitu pukul 08.00 dan 16.00 WIB (Farias *et al.*, 2016).

Bakteri yang digunakan adalah bakteri kandidat probiotik yang diperoleh Haditomo *et al.* (2017) dengan kode isolat CBL20 yang merupakan hasil *screening* bakteri lumpur budidaya ikan nila di Boyolali, Jawa Tengah. Bakteri ini telah diidentifikasi berdasarkan analisis *sequence* 16sRNA dan kemudian membandingkan dengan *sequence* di NCBI sehingga diperoleh jenis bakteri *B. methylotrophicus* strain XJAJ2 dengan tingkat homologi 100%. Bakteri patogen pada penelitian ini adalah *Aeromonas hydrophila*. Isolat murni *A. hydrophila* diperoleh dari proses isolasi bakteri pada media budidaya ikan nila yang terjadi kematian masal di Laboratorium Basah Universitas Diponegoro yang telah dilakukan uji biokimia untuk proses identifikasi (Haditomo, 2017).

Media pemeliharaan menggunakan air tawar, berasal dari air pam yang telah diendapkan terlebih dahulu pada bak tandon selama satu minggu dan telah disterilkan menggunakan kaporit cair 10 ppm dan natrium tiosulfat 20 ppm. Volume air adalah 10 L per akuarium. Wadah yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuarium dengan ukuran 40 cm x 30 cm x 40cm dengan kapasitas 48 L air. Jumlah akuarium yang digunakan untuk penelitian ini sebanyak 12 buah dan dilengkapi sistem aerasi.

Media yang digunakan adalah *Tryptic Soy Agar* (TSA) untuk proses uji *in vitro* (Ulkhag *et al.*, 2014) dan kultur isolat murni. Media selektif *Glutamate Starch Phenol* (GSP) sebagai media kultur *A. hydrophila* dan uji pasase. Media TSB (*Tryptic Soy Broth*) digunakan sebagai media kultur cair.

Prosedur penelitian ini terdiri dari tahap persiapan dan tahap pelaksanaan. Tahap persiapan terdiri dari sterilisasi alat dan bahan, aklimatisasi ikan uji, pembuatan media bakteri, kultur bakteri dan penganganan bakteri. Alat-alat mikrobiologi disterilkan dengan cara dicuci kemudian *autoclave* suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama 20 menit (Andriani, 2016). Alat untuk *streak* bakteri disterilisasi menggunakan alkohol 70% kemudian dibakar diatas api bunsen.

Tahap pelaksanaan terdiri dari uji *in vitro*, uji pendahuluan (penentuan dosis), dan uji *in vivo*. Uji *in vitro* yang dilakukan adalah uji zona hambat dengan melihat ada tidaknya zona bening di sekitar kertas cakram dan diukur diameternya. Kertas cakram direndam pada konsentrasi tertentu *B. methylotrophicus* kemudian ditanam pada media TSA yang sudah dispread *A. hydrophila*. Pengamatan hasil dilakukan setelah 24 jam.

Uji pendahuluan (penentuan dosis) mengacu pada penelitian Agustina *et al.*, 2018 dilakukan melalui aplikasi *B. methylotrophicus* pada media budidaya ikan nila yang terdapat *A. hydrophila* 10<sup>2</sup> CFU/mL dan diamati respon ikan nila selama 14 hari pemeliharaan. Konsentrasi bakteri kandidat probiotik yang diujikan yaitu 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup> CFU/mL sebanyak 4 perlakuan (1 perlakuan kontrol tanpa diberikan bakteri kandidat probiotik) 3 kali ulangan. Kepadatan 1 ekor/L atau 10 ekor per akuarium. Parameter yang diamati adalah kelulushidupan, gejala klinis, profil darah dan jumlah kepadatan bakteri pada media budidaya (Haditomo *et al.*, 2016). Hasil uji pendahuluan terbaik yakni pada perlakuan D dengan SR sebesar 56, 67%.

Uji *in vivo* mengacu pada penelitian Agustina *et al.* (2018). Media budidaya steril disiapkan sebanyak 10 L per akuarium. Kemudian media diberi *A. hydrophila* 10<sup>2</sup> CFU/mL dan *B. methylotrophicus* kepadatan 10<sup>9</sup> CFU/mL diberikan dengan waktu pemberian yang berbeda yakni setiap 3 hari sekali (b) 5 hari sekali (c) 7 hari sekali (d) dan tanpa diberikan *B. methylotrophicus* (a). Ikan uji 10 ekor setiap akuarium (padat tebar 1 ekor/L) dimasukkan ke dalam akuarium yang telah diberi bakteri dan diamati selama 21 hari.

Metode yang digunakan adalah eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL) 4 perlakuan dan 3 ulangan. Penelitian ini menggunakan perlakuan pemberian *A. hydrophila* 10<sup>2</sup> CFU/mL pada media pemeliharaan dan penambahan *B. methylotrophicus* 10<sup>9</sup> dengan waktu pemberian:

Perlakuan A : tanpa diberikan *B. methylotrophicus*  
 Perlakuan B : diberikan 10<sup>9</sup> CFU/mL setiap 3 hari sekali  
 Perlakuan C : diberikan 10<sup>9</sup> CFU/mL setiap 5 hari sekali  
 Perlakuan D : diberikan 10<sup>9</sup> CFU/mL setiap 7 hari sekali

Ikan diberikan pakan secara *at satiation* sebanyak 2 kali (pagi dan sore hari) yaitu pukul 08.00 dan 16.00 WIB. Pakan yang digunakan adalah pakan komersil berbentuk pelet dengan kadar protein 35%, dan selama 21 hari perlakuan tidak dilakukan penyiponan.

## HASIL

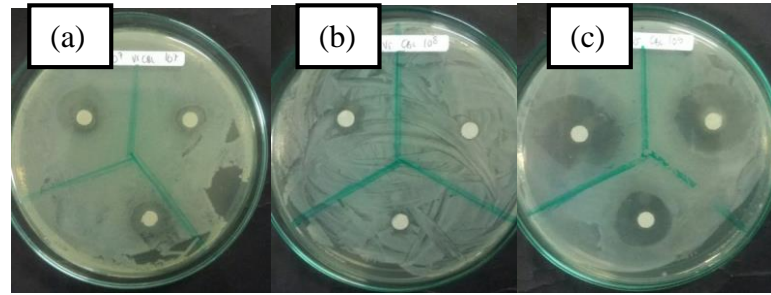
### 1. Uji In Vitro

Berdasarkan uji zona hambat, diperoleh hasil yang tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Diameter zona hambat

No.	Kepadatan bakteri probiotik ( <i>B. methylotrophicus</i> ) CFU/mL	Diameter zona hambat (mm)			Rata-rata±SD (mm)
		1	2	3	
1	10 <sup>3</sup>	7	7,2	7	7,07±0,12
2	10 <sup>4</sup>	8	8	7,2	7,73±0,46
3	10 <sup>5</sup>	9	7	8	8±1
4	10 <sup>6</sup>	8,3	8,6	8,6	8,5±0,2
5	10 <sup>7</sup>	12,8	14,7	18	15,2±2,63
6	10 <sup>8</sup>	10	7	7	8±1,7
7	10 <sup>9</sup>	20,6	29	25	24,9±4,2

Gambar hasil uji zona hambat dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Diameter zona hambat (a) konsentrasi *B. methylotrophicus* 10<sup>7</sup> CFU/mL, (b) *B. methylotrophicus* 10<sup>8</sup> CFU/mL, (c) *B. methylotrophicus* 10<sup>9</sup> CFU/mL

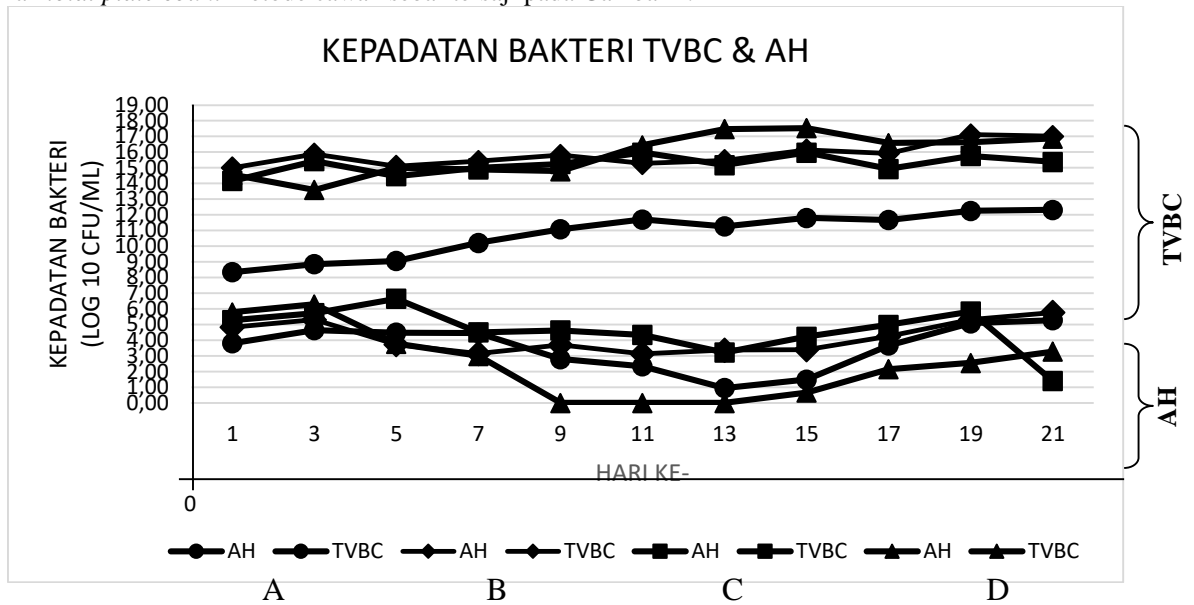
Rata-rata diameter zona bening yang tertinggi pada kepadatan bakteri *B. methylotrophicus* 10<sup>9</sup> CFU/mL yaitu 24,9±4,2 mm. Kepadatan *B. methylotrophicus* kemudian yang digunakan pada uji *in vivo* adalah 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, dan 10<sup>9</sup> CFU/mL.

**2. Kelulushidupan**

Kelulushidupan tertinggi adalah perlakuan D (13,33%) diikuti oleh A (6,67%), dan terendah perlakuan C (3,33%) dan B (3,33%). Penambahan *B. methylotrophicus* mampu meningkatkan kelulushidupan sebesar 6,66%. Hasil uji analisis ragam menunjukkan bahwa pemberian bakteri *B. methylotrophicus* pada media budidaya dengan waktu pemberian yang berbeda tidak berpengaruh nyata terhadap kelulushidupan ikan nila (*O. niloticus*) yang diinfeksi *A. hydrophila* melalui media budidaya (P>0,05).

**3. Kelimpahan Bakteri**

Total kepadatan bakteri *A. hydrophila* dan total kepadatan bakteri pada air media pemeliharaan berdasarkan *total plate count* metode cawan sebar tersaji pada Gambar 2.



Gambar 2. Grafik Kepadatan TVBC & AH

Keterangan:

TVBC: *total viable bacteria count*

AH: *Aeromonas hydrophila*

A: Perlakuan A (tanpa diberikan *B. methylotrophicus*)

B: Perlakuan B (diberikan *B. methylotrophicus* 10<sup>9</sup> CFU/mL setiap 3 hari sekali)

C: Perlakuan C (diberikan *B. methylotrophicus* 10<sup>9</sup> CFU/mL setiap 5 hari sekali)

D: Perlakuan D (diberikan *B. methylotrophicus* 10<sup>9</sup> CFU/mL setiap 7 hari sekali)

Total bakteri pada media budidaya rata-rata cenderung meningkat hingga hari ke-11 kemudian mengalami penurunan hingga hari ke-15 dan kemudian cenderung meningkat kembali hingga hari ke-21, untuk kepadatan *A. hydrophila* rata-rata meningkat dari awal hingga hari ke-5 dan semakin menurun hingga hari ke-15, namun hanya pada perlakuan D yang mengalami penurunan jumlah bakteri *A. hydrophila* yang paling tinggi dan kembali meningkat pada hari ke 16 hingga pada akhir penelitian. Total bakteri pada perlakuan A dan B mengalami peningkatan dari awal penelitian hingga akhir penelitian. Total bakteri akhir penelitian pada perlakuan A adalah 21,25 x 10<sup>12</sup> CFU/mL terdapat bakteri *A. hydrophila* sebanyak 5,9 x 10<sup>6</sup> CFU/mL, perbandingan bakteri *A.*

*hydrophila* dengan bakteri keseluruhan adalah  $1:10^5$ . Perlakuan B menunjukkan peningkatan jumlah bakteri pada akhir penelitian sebesar  $1,6 \times 10^{16}$  CFU/mL dengan jumlah *A. hydrophila*  $5,2 \times 10^6$  sehingga perbandingan bakteri *A. hydrophila* dengan bakteri keseluruhan adalah  $1:10^{10}$ . Perlakuan C menunjukkan peningkatan jumlah bakteri pada akhir penelitian (hari ke-21) sebesar  $2,5 \times 10^{15}$  CFU/mL dengan jumlah *A. hydrophila*  $2,5 \times 10^1$  CFU/mL perbandingan bakteri *A. hydrophila* dengan bakteri keseluruhan adalah  $1:10^{13}$ . Perlakuan D menunjukkan kenaikan jumlah bakteri pada hari ke-9 hingga akhir penelitian dengan jumlah bakteri total  $8,7 \times 10^{16}$  CFU/mL dengan jumlah *A. hydrophila*  $3,9 \times 10^4$  CFU/mL perbandingan bakteri *A. hydrophila* dengan bakteri keseluruhan adalah  $1:10^{11}$ . Perbandingan jumlah *A. hydrophila* dengan bakteri keseluruhan pada hari ke-1 adalah  $1:10^9$  untuk perlakuan D, B sedangkan perlakuan C adalah  $1:10^8$  untuk perlakuan A adalah  $1:10^4$ .

#### 4. Gejala Klinis

Gejala klinis ikan nila selama 21 hari perlakuan tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Gejala Klinis Perubahan Tingkah Laku dan Morfologi Ikan Nila

Hari ke	A			B			C			D		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	a,c	a,c	a,c	a	a,c	a,c	a	a	a,c	a,c	a,c	a,c
2	b,c,d	b,c,d	a,c	a	a,c	A	a,c	a	b,c	b,c	b,c	b,c
3	b,c,d	b,c,d	b,c	a	a,c	A	b,c,d	a	b,c,d	b,c,d	a,c	b,c
4	b,c	b,c,d	b,c	a	b,c	A	b,c,d	a	-c,d	b,c,d	b,c,d	b,c,d
5	b,c	b,c,d	-c	a	b,c	a,c	-c,d	a	-c,d	-c,d	b,c,d	b,c,d
6	b,c	b,c,d	-c	a	b,c	a,c	-c,d	a		-c,d	b,c,d	b,c
7	b,c	b,c,d	b,c	a,c	b,c	b,c	b,c,d	a		-c,d	b,c,d	b,c
8	b,c,d	b,c	b,c	a,c	b,c	b,c	b,c,d	a,c		b,c	b,c	b,c,e
9	b,c,d	b,c	b,c	a,c	b,c	b,c,d	b,c,d	a,c		b,c	b,c	b,c
10	b,c,d	b,c	a,c	a,c	a,c	b,c,d	b,c,d	a,c		b,c	b,c	b,c
11	b,c,d	b,c	a,c	a,c	a,c	b,c,d	b,c,d	a,c		b,c	b,c,d	b,c
12	b,c	b,c	b,c	a,c	b,c	b,c,d	b,c	a,c		a,c	b,c,d	b,c
13	b,c	b,c	b,c	a,c	b,c,d	b,c	b,c	b,c		a,c	a,c	b,c,d
14	b,c	b,c	b,c	b,c	b,c,d	b,c	b,c	b,c		a,c	a,c	-c,d
15	-b,c,d	b,c	b,c	b,c	b,c,d	b,c	b,c	b,c,d		a,c	a,c	-c,d
16	-b,c,d	b,c	-c	b,c	-c,d	b,c	b,c	-c,d		a,c	a,c	b,c
17	-b,c	b,c	-c	-c	-c,d	b,c	b,c	-c,d		a,c	a,c	b,c
18	-b,c	b,c	-c,d	-c	b,c,d	-c	a			a,c	a,c	b,c
19	-b,c	a,c	-c,d	-c	b,c	-c	a,c			a,c	a,c	b,c,d
20	-b,c	a,c	-c,d	-c	a,c	-c	a,c			a,c	a,c	-c,d
21	-b,c	a,c	-c,d	-c	a,c	-c	a,c			a,c	a,c	b,c,d

Keterangan:

- : ikan tidak merespon pakan, sangat pasif, A : aktif, respon pakan cepat, B : pasif, berenang tidak stabil dan di dekat aerasi, respon pakan lambat, C : lendir berlebih, warna kulit pucat, sirip punggung meregang, D : sirip ekor geripis, sisik lepas, E : mata menonjol (*exophthalmia*)

Gejala klinis ikan nila tersaji pada Tabel 2 menunjukkan terjadi perubahan tingkah laku dan morfologi. Gejala klinis pada perlakuan A sebagian besar ikan nila bergerak pasif, berenang tidak stabil dan cenderung mendekati aerasi, respon terhadap pakan yang diberikan lambat, lendir berlebih dihasilkan oleh ikan, warna kulit pucat, sirip punggung meregang, sirip ekor geripis, sisik mengelupas (Gambar 3a, 3b, 3c). Beberapa ikan juga muncul gejala klinis berupa *operculum* terlihat memerah. Tujuh hari mendekati akhir penelitian, ikan nila masih tidak merespon pakan dengan baik.



Gambar 3. Gejala Klinis Ikan Nila Selama Penelitian

Keterangan: a. *Exophthalmia* ; b. Sirip geripis, c. *Operculum* memerah, Sisik mengelupas

Tabel 3. Gejala klinis yang terjadi selama perlakuan

No	Organ	Gejala Klinis	Morfologi	Tingkah Laku
1	Insang	Haemoragi	Warna merah pada insang dan <i>operculum</i>	Berenang dipermukaan, mendekati aerasi dan pergerakan mulut cepat
2	Sirip	Haemoragi	Warna memerah pada pangkal sirip	-
3	Sirip	Geripis	Sirip habis, dan geripis	-
4	Sisik	Sisik terlepas	Sisik terlepas dari tubuh	-
5	Otak	Berenang abnormal	-	Ikan berenang berputar-putar ( <i>whirling</i> )
6	Abdomen	<i>Dropsy</i>	Terlihat kembang dan dipenuhi cairan	-
7.	Mata	<i>Exophthalmia</i>	Mata menonjol keluar dan buram	-

Ikan nila menunjukkan gejala klinis berupa sirip geripis terjadi di hari ke-2 pada perlakuan A, sedangkan perlakuan D terjadi pada hari ke-4. Hari ke-7,8,9 atau mulai memasuki minggu ke-2 ikan nila semakin menunjukkan perubahan morfologi dan tingkah laku pada perlakuan A yaitu pasif, sirip punggung meregang, sirip geripis, dan ikan mulai pasif ketika diberikan pakan. Gejala klinis perlakuan B sudah mulai terlihat pasif, lendir berlebih, sirip meregang. Perlakuan C menunjukkan adanya ikan yang sudah mulai pasif, berenang dan berkumpul di dekat aerasi dan respon pakan mulai melambat dan morfologi menunjukkan produksi lendir berlebih ini terlihat dari air yang berbuih, warna pucat serta sirip meregang, sedangkan perlakuan D ikan nila mulai berenang pasif dan respon pakan melambat, *exophthalmia* dan tubuh memucat dan sirip meregang namun pada akhir penelitian beberapa ikan yang tersisa mulai kembali aktif kembali dan merespon pakan dengan baik.

Hari ke-10 dan 11 tidak menunjukkan perubahan dari hari sebelumnya pada perlakuan A, B, C dan D terlihat masih sama gejala yang terjadi seperti adanya perubahan morfologi dan tingkah laku berupa pasif, respon pakan lambat, berenang di atas permukaan mendekati aerasi, lendir berlebih, warna pucat dan sirip punggung meregang. Namun pada hari ke-11 dan 15 tidak ada ikan yang mengalami kematian dari seluruh perlakuan. Kemudian ikan nila perlakuan C pada hari ke-13, 14 dan 15 menunjukkan perubahan gejala klinis berupa ikan tidak merespon pakan, gerak lambat dan sangat pasif, berenang ke arah permukaan air dan mendekati aerasi, dan terlihat juga gejala berenang yang abnormal seperti berenang secara berputar atau *wirling* hingga pada hari ke-16 dan 17 terjadi kematian yang cukup banyak hingga 4-5 ekor ikan yang mati sekaligus. Perlakuan B tidak mengalami perubahan gejala klinis dari hari sebelumnya namun pada 7 hari sebelum penelitian berakhir, perlakuan mengalami perubahan gejala klinis ikan yang semakin pasif dan respon pakan semakin buruk sehingga juga mengalami kematian yang cukup tinggi yakni 4-5 ekor pada hari ke-20 dan 21, sedangkan pada minggu terakhir ikan yang tersisa pada perlakuan D menunjukkan ikan sudah mulai aktif kembali berenang secara normal, dan ketika diberikan pakan ikan merespon dengan baik.

### 5. Kualitas Air

Hasil pengukuran kualitas air selama penelitian pada semua perlakuan tersaji pada Tabel 4.

Tabel 4. Kisaran Parameter Kualitas Air Media Pemeliharaan Ikan Nila (*O. niloticus*) Selama Penelitian

Parameter	Perlakuan				Kisaran Optimum
	A	B	C	D	
DO (mg/L)	3,3 – 3,4	3,2 – 3,4	3,2 – 3,5	3,4 – 3,5	≥3 <sup>a)</sup>
Suhu (°C)	24 – 26	23 – 26	23 – 26	23 – 25	25 – 32 <sup>a)</sup>
pH	6 – 7	6 – 7	6 – 7	5 – 6	6,5 – 8,5 <sup>a)</sup>

Keterangan :

a) SNI (2009)

Kualitas air untuk suhu dan pH masih belum berada dalam kisaran optimum dan layak namun untuk DO masih terbilang layak untuk digunakan dalam media pemeliharaan ikan nila. Meskipun demikian, kadar suhu dan pH yang masih belum berada dalam kisaran layak selama penelitian ini terjadi dikarenakan cuaca yang tidak menentu pada saat penelitian. Selama penelitian tidak dilakukan pergantian air sama sekali pada akuarium perlakuan.

## PEMBAHASAN

Bakteri *B. methylotrophicus* dalam uji *in vitro* yakni uji zona hambat dan uji tumbuh bersama didapatkan hasil bahwa bakteri *B. methylotrophicus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Hal ini terbukti dengan adanya zona hambat (zona bening) yang dihasilkan pada kertas cakram (Gambar 1). Konsentrasi *B. methylotrophicus* dengan zona hambat paling besar yakni sebesar  $10^9$  CFU/mL dengan rerata zona hambat  $24,49 \pm 4,2$  mm kemudian pada kepadatan  $10^7$  CFU/mL dengan rerata zona hambat  $15,2 \pm 2,63$  mm, kepadatan  $10^6$  CFU/mL dengan zona hambat  $8,5 \pm 0,2$  mm dan kepadatan  $10^8$  CFU/mL rerata zona hambatnya yaitu  $8 \pm 1,7$  mm. Kemampuan daya hambat *B. methylotrophicus* terhadap *A. hydrophila* dapat dikatakan kuat (sensitif) pada kepadatan probiotik  $10^9$  CFU/mL, sedang (intermediet) untuk kepadatan probiotik  $10^7$  CFU/mL, dan lemah (resisten) untuk kepadatan probiotik  $10^8$  dan  $10^6$  CFU/mL. Hal ini sesuai dengan pernyataan Afnidar (2014), bahwa diameter zona hambat yang menunjukkan hasil lebih besar dari 20 mm, maka dapat dikatakan respon hambatan pertumbuhannya tergolong kuat (sensitif). Hasil pengukuran zona hambat 16-20 mm maka hambatan pertumbuhannya tergolong sedang (intermediet) dan apabila hasil pengukuran sebesar 1-15 mm hambatan pertumbuhannya tergolong lemah (resisten), dan jika 0 mm maka tidak ada respon hambatan pertumbuhan yang terjadi. Terbentuknya zona hambat yang besar pada kepadatan *B. methylotrophicus*  $10^9$  CFU/mL menunjukkan adanya interaksi antagonis yang terjadi antara bakteri kandidat probiotik dengan *A. hydrophila*. Interaksi ini dapat berkaitan karena adanya persaingan nutrisi media pertumbuhan bakteri dan adanya senyawa antimikroba atau bakteriosin yang diproduksi oleh *B. methylotrophicus*. Desriac *et al.* (2010) menyatakan secara umum, bakteri menghasilkan beberapa jenis senyawa anti-mikroba atau bakteriosin untuk menghambat atau membunuh spesies bakteri pesaing lainnya. Hal ini diperkuat oleh Sorokulova *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa probiotik dari golongan *Bacillus* telah banyak diaplikasikan untuk kepentingan bioteknologi termasuk jenis enzim dan asam amino yang dihasilkan serta produksi antibiotik untuk fermentasi dan pengendalian patogen.

*B. methylotrophicus* mampu menghambat *A. hydrophila* yang merupakan bakteri Gram negatif hal ini diperkuat pula oleh Sharma *et al.* (2013) yang diketahui bahwa *B. methylotrophicus* mampu secara aktif menghambat bakteri patogen baik Gram positif, maupun Gram negatif. Dikarenakan mengandung lipopeptida siklik dengan kisaran yang luas. Polipeptida merupakan polimer yang tersusun dari beberapa peptida hasil pengikatan gugus karboksil (COOH) dengan gugus amino. Satu atau lebih polipeptida dapat membentuk protein, contohnya enzim. Polipeptida terbentuk melalui proses ekspresi gen yang terjadi di dalam sel. Iturin dan surfaktin adalah contoh antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan jamur (Huang *et al.*, 1993). Lebih lanjut Jemil *et al.* (2017) menjelaskan karakter struktural dan identifikasi dari lipopeptida siklik yang dihasilkan *B. methylotrophicus* DCS1. Sampel lipopeptida sederhana dari *B. methylotrophicus* tersusun sekitar 40% protein. Berbagai asam amino terdeteksi pada lipopeptida kasar DCS1 (*B. methylotrophicus*), sebagian besar asam amino yang menyusun komposisi lipopeptida termasuk dalam keluarga surfaktin, surfaktin, iturin dan fengycin. Surfaktin adalah antibiotik yang memiliki kerja sebagai suatu biosurfaktan, surfaktin dapat merusak permeabilitas membran sel dengan cara menurunkan tegangan permukaan (Huang *et al.*, 1993).

Kelulushidupan atau *survival rate* tertinggi hingga terendah pada akhir masa pemeliharaan adalah perlakuan D (penambahan *B. methylotrophicus* 7 hari sekali) sebesar 13,33 % diikuti perlakuan A (tidak ditambahkan *B. methylotrophicus*) 6,67 %, perlakuan C (penambahan *B. methylotrophicus* 5 hari sekali) dan B (penambahan *B. methylotrophicus* 3 hari sekali) sebesar 3,33 %. Hasil uji analisis ragam data kelulushidupan menunjukkan bahwa penambahan bakteri *B. methylotrophicus* pada media budidaya ikan nila dengan frekuensi pemberian yang berbeda tidak berpengaruh nyata terhadap kelulushidupan ikan nila (*O. niloticus*) yang terinfeksi oleh bakteri *A. hydrophila* melalui media budidaya atau air ( $P > 0,05$ ). Hal ini diduga karena menurunnya efektifitas bakteri probiotik yang disebabkan frekuensi pemberian probiotik yang terlalu sering sehingga menambah konsentrasi bakteri pada media pemeliharaan dan menyebabkan keseimbangan bakteri pada media pemeliharaan terganggu. Konsentrasi bakteri yang terlalu tinggi juga dapat mengakibatkan persaingan nutrisi, oksigen maupun ruang diantara sesama bakteri probiotik yang ditambahkan. Dugaan ini diperkuat oleh Sya;bani *et al.* (2015), yang menyatakan bahwa pemberian probiotik yang dilakukan secara terus menerus dapat menurunkan keefektifannya, sehingga pemberian probiotik dengan waktu yang berselang akan lebih efektif dan dapat menghasilkan sistem imun yang lebih baik karena setiap probiotik yang masuk ke dalam tubuh dapat langsung merangsang aktifnya sistem imun. Nikoskelainen *et al.* (2001) juga menyatakan bahwa penggunaan probiotik dalam konsentrasi tinggi ternyata tidak menjamin perlindungan yang lebih baik terhadap inang.

Perkembangan jumlah populasi total bakteri yang terdapat pada media pemeliharaan di akhir penelitian menunjukkan angka  $10^{12}$  CFU/mL pada perlakuan A, kemudian pada perlakuan B adalah  $10^{17}$  CFU/mL dan C adalah  $10^{15}$  CFU/mL, sedangkan pada perlakuan D menunjukkan angka  $10^{17}$  CFU/mL. Perbandingan jumlah A.

*hydrophila* dengan bakteri keseluruhan didalam air pada hari ke-1 adalah  $1:10^3$  untuk perlakuan A, Perlakuan B  $1:10^9$ , sedangkan perlakuan C, D adalah  $1:10^8$ . Jumlah bakteri ini belum menyebabkan munculnya gejala klinis pada ikan nila selama hari ke-1, namun terjadi kematian pada perlakuan B dan C pada hari ke 1, kemudian pada hari ke-2 dan ke 3 ikan nila perlakuan A dan D mulai menunjukkan gejala klinis berupa sirip geripis, dan ikan mulai berenang ke permukaan mendekati aerasi, dan mulai terjadi kematian pada perlakuan A, C, dan D Hari ke-15 menunjukkan nilai  $1:10^7$  untuk perlakuan A, perlakuan B  $1:10^{12}$  dan sama sama tidak terjadi kematian, C  $1:10^{10}$  dengan jumlah kematian ikan 2 ekor, perlakuan D adalah  $1:10^{14}$  tidak ada kematian ikan dari perlakuan D. Hari ke-21 (akhir penelitian) menunjukkan nilai  $1:10^6$  untuk perlakuan A dan menyebabkan 1 kematian ikan, perlakuan B  $1:10^{10}$  dan menyebabkan kematian 5 ekor ikan. Perlakuan C  $1:10^{12}$  dengan jumlah kematian ikan 1 ekor, perlakuan D adalah  $1:10^{12}$  menyebabkan kematian 1 ekor ikan. Nilai ini menunjukkan populasi bakteri pada media yang tertinggi adalah perlakuan D yang diduga karena adanya interaksi antar *B. methylotrophicus* dengan bakteri lain diduga dapat membuat resiko terjadinya kematian akibat serangan *A. hydrophila* dapat sedikit tertunda.. Konsentrasi bakteri *B. methylotrophicus* yang tinggi pada perlakuan D menyebabkan kematian yang lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Hal ini diduga dikarenakan bakteri dalam air dengan konsentrasi yang tinggi dapat menekan *A. hydrophila* sehingga tidak dapat menyebabkan kematian diduga hal ini terjadi karena bakteri tersebut berperan menghasilkan senyawa anti bakteri ataupun dengan cara menjadi pesaing bagi *A. hydrophila*. Selain itu, diduga kandungan surfaktan dan iturin pada *B. methylotrophicus* menyebabkan lisisnya bakteri lain termasuk *A. hydrophila*. Hal ini diperkuat oleh Balcazar *et al.* (2004), yang menyatakan bahwa bakteri *bacillus* menghasilkan beberapa zat antimikroba atau produk ekstraseluler yang dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri *A. hydrophila* diantaranya adalah bakteriosin, subtilin, koagulin, dan antibiotik surfaktan, iturins dan basilin. Lang & Wagner (1993) menyatakan bahwa surfaktan yang merupakan lipopeptida siklik selain berfungsi menurunkan tegangan permukaan zat cair juga merusak sferoplas serta protoplas bakteri lain yang berada di dekat bakteri penghasilnya.

Perkembangan jumlah populasi *A. hydrophila* tanpa pemberian *B. methylotrophicus* (perlakuan A) pada akhir penelitian adalah  $10^5$  CFU/mL, sedangkan jumlah populasi *A. hydrophila* pada perlakuan pemberian *B. methylotrophicus* setiap 3 hari (perlakuan B) adalah  $10^6$  CFU/mL, pada perlakuan pemberian *B. methylotrophicus* setiap 5 hari (perlakuan C) adalah  $10^2$  CFU/mL, pada perlakuan pemberian *B. methylotrophicus* setiap 7 hari (perlakuan D) adalah  $10^3$  CFU/mL. Hal ini diduga terjadi disebabkan adanya senyawa ekstraseluler yang dihasilkan oleh *Bacillus*. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa secara *in vitro*, probiotik *Bacillus* dapat menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* (Sansawat & Thirabuyanon, 2009). Senyawa ekstraseluler yang dihasilkan oleh *Bacillus*, antara lain esterase lipase, *leucine arylamidase*, *acid phosphatase*, lipase, naphthol- AS-BI-*phospholidase*, subtilin, coagulin, surfaktan, iturin, dan bacilysin (Murilio & Villamil, 2011). Surfaktan dan iturin inilah yang secara aktif merusak permeabilitas membran dari bakteri *A. hydrophila*.

Ikan nila pada hari ke-1 pasca dimasukkan pada media air menunjukkan ikan tetap aktif dan respon pakan cepat pada perlakuan A (kontrol), dan perlakuan B, C, D belum menunjukkan gejala klinis perubahan morfologi hingga hari ke-2. Ikan nila mulai menunjukkan gejala klinis hari ke-3 dan ke-4 perlakuan A menunjukkan ikan pasif, respon pakan lambat, berenang tidak stabil di dekat aerasi, lendir berlebih, warna kulit pucat, sirip punggung meregang, dan terlihat sisik mulai lepas, terdapat hemoragik pada beberapa bagian tubuh seperti *operculum* dan ekor geripis terlihat pada ikan yang mati. Gejala klinis tingkah laku ini sesuai dengan Hardi *et al.* (2014) gejala klinis ikan nila yang terinfeksi *A. hydrophila* melalui perendaman yakni ikan mengalami berenang gasping (berenang tegak dibawah permukaan air), berenang di dasar akuarium, sisik lepas, sirip geripis, gerak reflek lambat, gerakan *operculum* cepat cenderung mendekati aerasi, *exophthalmia*, *haemoragi* dan nafsu makan yang menurun.

Hari ke- 5 hingga ke 14, pada perlakuan A beberapa ikan pasif, lendir berlebih, warna kulit pucat, sirip geripis, pangkal ekor mulai terlihat merah, namun masih terdapat ikan yang aktif dan tubuh pucat. Ikan nila perlakuan B pasif, respon pakan lambat, beberapa ikan masih berenang mendekati aerasi, lendir berlebih, warna pucat, namun sebagian besar aktif, respon pakan cepat. Ikan nila perlakuan C sebagian besar aktif, respon pakan mulai pasif, ikan pucat, sirip geripis, dan ada juga yang pasif bereenang di dasar akuarium, sedangkan perlakuan D perubahannya adalah kulit pucat, lendir berlebih, dan sirip geripis pada beberapa ikan, dan ada yang mengalami mata membesar (*exophthalmia*) pada ikan yang mati. Hari ke-14,15,16 ikan nila semakin menunjukkan perubahan morfologi dan tingkah laku pada perlakuan A yaitu pasif, sirip punggung meregang, sirip geripis, dan beberapa ikan yang mati *operculum* nya terlihat memerah atau terkena *Haemoragi*. Gejala klinis *haemoragi* diduga diakibatkan karena adanya toksin yang disebabkan oleh *A. hydrophila* yaitu toksin hemolisin. Hal ini juga diperkuat juga oleh Chopra *et al.* (2000) Luka dan hemoragik yang terjadi pada tubuh ikan diduga disebabkan oleh toksin ekstraseluler yang bekerja bersinergi merusak jaringan pada tubuh ikan. Hemolisin yang dihasilkan oleh bakteri tersebut bekerja memecah dan melisiskan sel-sel darah merah. Hal tersebut terlihat dengan adanya luka dan pendarahan pada tubuh ikan.

Hari ke-17 dan 19 tidak menunjukkan perubahan dari hari sebelumnya pada perlakuan A, B dan C, sedangkan perlakuan D ikan ikan yang masih tersisa menunjukkan adanya perubahan morfologi dan tingkah laku berupa aktif kembali, respon pakan membaik, berenang normal namun masih mendekati aerasi, lendir berlebih,



warna pucat dan sirip punggung masih meregang. Kemudian ikan nila perlakuan A,B, dan C pada hari ke-20, dan 21 menunjukkan perubahan gejala klinis berupa ikan tidak merespon pakan, gerak lambat dan sangat pasif. Perlakuan D beberapa ikan masih menunjukkan lendir berlebih, pucat, pasif, sirip geripis, namun beberapa ikan ada yang sudah normal kembali. Gejala klinis pada akhir perlakuan ini menunjukkan adanya proses *recovery* karena beberapa ikan yang masih tersisa (hidup) sudah mulai aktif dan respon pakannya membaik, hanya saja beberapa ikan nila juga terlihat masih pasif.

Hasil nilai kualitas air pada media pemeliharaan pada beberapa variabel seperti suhu bagi bakteri *B. methylothrophicus* masih dalam kondisi bisa untuk tumbuh namun belum mencapai nilai suhu optimum bagi *B. methylothrophicus* untuk tumbuh secara optimum, namun untuk nilai pH yang didapat selama masa pemeliharaan masih tergolong baik karena nilai optimum bagi *B. methylothrophicus* untuk tumbuh yakni pada nilai pH 6. Hal ini diperkuat oleh Ngoc *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa kondisi kultur yang optimum bagi *B. methylothrophicus* teridentifikasi pada suhu 30 °C dan pH 6. Sementara hasil kualitas air terutama pada variabel suhu masih dalam kisaran yang baik bagi bakteri *A. hydrophila* untuk tumbuh karena kisaran yang didapat yakni berkisar antara 23-26 °C. *A. hydrophila* memiliki rentang suhu yang cukup tinggi untuk tumbuh sesuai dengan Olga (2012) bahwa bakteri *A. hydrophila* dapat ditemukan dimana-mana, terutama di perairan yang mengandung bahan organik tinggi. Disamping itu, bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 4 – 45 °C, meskipun lambat dan tumbuh optimum pada suhu 37 °C

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

1. Penggunaan bakteri kandidat probiotik *B. methylothrophicus* dalam media budidaya dapat mengontrol kepadatan bakteri *A. hydrophila* dalam media pemeliharaan pada akhir penelitian tertinggi  $10^5$  CFU/ml pada perlakuan A, dan B, Perlakuan D  $10^3$  CFU/ml dan terendah  $10^2$  CFU/ml pada perlakuan C namun masih belum optimum;
2. Penggunaan bakteri kandidat probiotik *B. methylothrophicus* dalam media budidaya dapat menghambat atau menekan kepadatan *A. hydrophila* dalam media pemeliharaan. Terlihat pada perlakuan C dan D kelimpahan bakteri *A. hydrophila* mulai dari pertengahan masa pemeliharaan hingga akhir masa pemeliharaan hanya berkisar tidak lebih dari  $10^3$ - $10^5$  CFU/ml;
3. Penggunaan bakteri kandidat probiotik *B. methylothrophicus* dalam media budidaya tidak menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap kelulushidupan ikan nila yang dipelihara selama 21 hari, namun pemberian bakteri kandidat probiotik *B. methylothrophicus* dapat meningkatkan SR dari ikan nila 6,66 % dibandingkan SR perlakuan kontrol yang tidak ditambahkan bakteri *B. methylothrophicus*.

### Saran

1. Penentuan rentang frekuensi penambahan bakteri kandidat probiotik *B. methylothrophicus* untuk mengetahui frekuensi penambahan yang terbaik pada pemeliharaan ikan nila;
2. Disarankan penelitian lebih lanjut tentang penambahan bakteri kandidat probiotik *B. methylothrophicus* pada media budidaya ikan nila dengan perhitungan kepadatan setiap hari sehingga dapat lebih terlihat bagaimana pertumbuhan dari *A. hydrophila* yang lebih baik.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada APBN DPA SUKPA Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro, yang telah mendanai sepenuhnya penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afnidar. 2014. Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kalus Tumbuhan Sernai (*Wedelia biflora* (L)Dc.). J. JESBIO. 3(4), ISSN: 2302-1705.
- Agustina, P. A.H.C, Haditomo. Sarjito. 2018. Penambahan Bakteri Kandidat Probiotik (*Bacillus methylothrophicus*) Dengan Konsentrasi Berbeda Pada Media Budidaya Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Untuk Pencegahan Serangan *Aeromonas hydrophila*. [SKRIPSI]. Universitas Diponegoro. 85 hlm.
- Andriani, R. 2016. Pengenalan Alat-Alat Laboratorium Mikrobiologi Untuk Mengatasi Keselamatan Kerja dan Keberhasilan Praktikum. J Mikrobiologi 1(1) ISSN : 01A114084.
- Balcazar JL, de-Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Vendrell D, Muzquiz JL. 2004. Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management. J. of Aquaculture in the Tropics. 19: 239–242.
- Chopra A, K. X, J, Xu. D, Ribardo. M, Gonzalez. K, Kuhl. J, W, Peterson. C, W, Houston. 2000. The Cytotoxic Enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* Induces Proinflammatory Cytokine Production and Activates Arachidonic Acid Metabolism in Macrophages. J. Infection and Immunity. 68(5). Page : 2808–2818.
- Das,S. K, Mondal. Salma, H. 2017. A review on application of probiotic, prebiotic and synbiotic for sustainable development of aquaculture. J of Entomology and ZoologyStudies. 5(2): 422-429.

- Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Chevalier, P.L., Fleury, Y., 2010. Bacteriocin as Weapons in the Marine Animal-Associated Bacteria Warfare: Inventory and Potential Applications as an Aquaculture Probiotic. *Mar. Drugs*, 8: 1153–1177.
- Esteban, M.A. H. Cordero. M, M, Tom. A, M, J, Monreal. A, Bakhrouf. A, Mahdhi. 2014. Effect of dietary supplementation of probiotics and palm fruits extracts on the antioxidant enzyme gene expression in the mucosae of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *J Fish & Shellfish Immunology* :1-9.
- Farias, T.H.V., Levy-Pereira, N., L.D.O. Alves, D.D.C. Dias, L. Tachibana, F. Pilarski, M.A.D.A. Belo, M.J.T.Ranzani-Paiva. 2016. Probiotic Feeding Improves The Immunity of Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* Infection. *Animal Feed Science and Technology*, 211: 137–144.
- Garde, C, Thomas. B, M. Givskov, T. H. Jakobsen, M. Hentzer, A. Claussen, Kim. S, Jesper. F, T. Sams. 2010. Quorum Sensing Regulation in *Aeromonas hydrophila*. *J. Mol. Biol.* 396 : 49–857. doi:10.1016/j.jmb.2010.01.002.
- Haditomo, A.H.C., A.M. Lusiastuti, Widanarni. 2016. Studi *Bacillus Firmus* Sebagai Kandidat Probiotik Dalam Menghadapi *Aeromonas hydrophila* PADA Media Budidaya. *J Saintek Perikanan*, 11 (2): 111-114.
- Haditomo, A.H.C., Sarjito, Desrina, S.B. Prayitno, 2017. 10<sup>th</sup> Symposium On Disease in Asian Aquaculture (DAA 10), 28 Agustus 2017-1 September 2017, Bali, Indonesia. Screening of Isolated Potential Probiotic from Mud Aquaculture in Central Java Indonesia with Molecular Based.
- Hardi, E, H. Catur A, P. Triesna H. Rizki T, H. 2014. Infeksi *Aeromonas hydrophila* Melalui Jalur yang Berbeda Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Di Loa Kulu Kutai Kartanegara Kalimantan Timur. *J. Kedokteran Hewan*. 8 (2), ISSN : 1978 – 225X.
- Huang, C.H., T. Ano, and M. Shoda. 1993. Nucleotide sequence and characteristics of the gene, *lpa-14*, responsible for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis* RB14. *J of Fermentation and Bioengineering* 76: 445-450.
- Jemil, N., A.Manresa, F.Rabanal, H.B.Ayed, N.Hmidet, M.Nasri. 2017. Structural Characterization And Identification Of Cyclic Lipopeptides Produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain. *J of Chromatography B*, 1060: 374-386.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2013. Statistik Menakar Target Ikan Air Tawar. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Jakarta.
- Lang, S. & F. Wagner. 1993. Bioconversion of Oils and Sugars to Glycolipids. Dalam Kosaric N, editor. *Biosurfactants. Production. Properties. Application*. Marcel Dekker. New York. Hlm 346-382.
- Murilio I., L. Villamil. 2011. *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* Used as Probiotics in Rotifer *Branchionus plicatilis* Cultures. *J of Aquaculture Research and Development*, 07: 1–5.
- Ngoc, N, N. Nguyen V, C. Tran L, H. Pham T, T, G. 2016. Microbiological Characterization and Potential Application of Indigenous *B. methylotrophicus* Ba1 in Handling of *Canna edulis*. *Ker Processing Craft Village Wastewater. J Of Forest Science and Technology* No. 5. Page: 4-9.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., & Bylund, G. 2001. Protection of Rainbow Trout *Onchorhynchus mykiss* from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, 198: 229-236.
- Olga. 2012. Patogenisitas Bakteri *Aeromonas hydrophila* Asb01 Pada Ikan Gabus (*Ophicephalus striatus*). *J Sains Akuatik* 14 (1): 33 – 39
- Sansawat A, Thirabunyanon M. 2009. Anti- *Aeromonas hydrophila* Activity and Characterisation of Novel Probiotics Strains of *Bacillus subtilis* Isolated from the Gastrointestinal tract of Giant Freshwater Prawns. *Maejo International J of Science and Technology*, 3: 77–87.
- Sharma S.C.D., M.S.Shovon, M.G.S. Jahan, A.K.M. Asaduzzaman, Md. A.Rahman, K.K. Biswas, N. Abe, N.Roy. 2013. Antibacterial And Cytotoxic Activity of *Bacillus methylotrophicus*-SCS2012 Isolated From Soil. *J of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2 (4): 2293-2307.
- SNI 7550. 2009. Produksi ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Bleeker) kelas Pembesaran di Kolam Air Tenang. 5 hlm.
- Sorokulova, I. B. Iryna V, P. Muriel D. Irina G, O. Jen M, H. Simon M, C. Maria C. Urdaci. 2007. The Safety Of Two *Bacillus* Probiotic Strains For Human Use. *J. Dig Dis Sci*. 53:954–963. DOI 10.1007/s10620-007-9959-1.
- Sya'bani, N. Ayi, Y. Ike, R. A, M, Lusiastuti. 2015. Frekuensi Penambahan Probiotik *Bacillus sp* dan *Staphylococcus sp* pada Media Pemeliharaan Benih Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) untuk Ketahanan Terhadap *Aeromonas hydrophila*. *J, Perikanan Kelautan*. 6(2). Hal : 130-140.
- Ulkhag, M. F. Widanarni., A.M. Lusiastuti. 2014. Aplikasi Probiotik *Bacillus* Untuk Pencegahan Infeksi *Aeromonas hydrophilla* Pada Ikan Lele. *J Akuakultur Indonesia* 13 (2) : 105–114.