



Aktivitas Antibakteri dan Identifikasi Molekuler Kandidat Probiotik *Lactococcus cremoris* UBB7 Asal Saluran Pencernaan Ikan Beong (*Hemibagrus nemurus*) Berdasarkan Gen 16S rRNA

Antibacterial Activity and Molecular Identification of *Lactococcus cremoris* UBB7 As a Probiotic Candidate from The Digestive Tract of Asian Redtail Catfish (*Hemibagrus nemurus*) Based on 16S rRNA Gene

Adella Cika Utamie^{*1}, Eric Armando¹, Rahayu Wulan²

¹Departmen Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Tidar, Jl. Kapten Suparman No. 39, Magelang, Jawa Tengah-56116, Indonesia, Telp. (0293) 364113, Fax.:362438

²Departmen Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Tidar, Jl. Kapten Suparman No. 39, Magelang, Jawa Tengah-56116, Indonesia, Telp. (0293) 364113, Fax.:362438

*Corresponding Author: adellacikautamie@gmail.com

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2024

Revised 30 April 2025

Accepted 30 April 2025

Available online 30 April 2025

E-ISSN: 2829-1751

How to cite:

Oktavia, R et al., (2025). Macroalgal Diversity in Intertidal Zone of Mbuluk Beach, Gunungkidul, Indonesia. AQUACOASTMARINE: J. Aquat. Fish. Sci., 4(1), 17-30.

ABSTRACT

Ikan beong memiliki potensi pasar yang menjanjikan sebagai produk perikanan, namun produksi ikan ini menghadapi beberapa tantangan, termasuk pertumbuhan yang lambat, sifat kanibalisme yang tinggi, sensitivitas tinggi terhadap kualitas air, dan sangat rentan terhadap penyakit. Pemberian bakteri probiotik yang dikembangkan dari saluran pencernaan ikan dapat mencegah resistensi bakteri. Sebelumnya, bakteri asam laktat (BAL) dengan kode UBB7 dari saluran pencernaan ikan beong telah berhasil diisolasi. Namun, konfirmasi akurat tentang sifat antibakteri dan identifikasi spesies isolat bakteri ini belum pernah ditemukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengkonfirmasi sifat antibakteri dan mengidentifikasi spesies isolat UBB7 berdasarkan analisis gen 16S rRNA. Metode penelitian ini adalah pemurnian dan pewarnaan Gram isolat UBB7, ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis dan sekuensing. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan isolat UBB7 adalah bakteri Gram-positif berbentuk kokus dengan sifat antibakteri yang lebih kuat terhadap *Streptococcus agalactiae* dibandingkan dengan *Aeromonas hydrophila* (zona hambat 16,2 mm vs 14,1 mm). Nilai kemurnian DNA isolat UBB7 menunjukkan 1,98 (panjang gelombang/ λ = 260/280) dan 3,72 (λ = 260/230) dan memiliki panjang 1412 pasang basa (bp). Hasil Basic Local Alignment Search Tool BLAST menunjukkan bahwa isolat UBB7 diidentifikasi sebagai *Lactococcus cremoris* strain 4136. Bakteri ini dapat diaplikasikan lebih lanjut sebagai probiotik, jika diteliti secara luas di masa depan untuk industri akuakultur

Kata kunci: antibakteri, analisis gen, *Lactococcus cremoris*, isolat UBB7



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International.
10.32734/jafs.v4i1.20041

ABSTRAK

Asian redtail catfish possesses a promising marketable fishery product, but this fish production faces several challenges, including slow growth performance, high cannibalistic behavior, high sensitivity to water quality, and highly susceptible to disease. Thus, probiotic bacteria administration, developed from the digestive tract of the fish can prevent bacterial resistance. Previously, lactic acid bacteria (LAB), encoded as UBB7, from the digestive tract of Asian redtail catfish have been successfully isolated. However, an accurate confirmation on the antibacterial properties and species identification of this bacterial isolate has never been discovered. Therefore, bacterial species identification can be performed molecularly through the 16S rRNA gene region analysis. This study aimed to confirm the antibacterial properties and identify the species of UBB7 isolate, based on the 16S rRNA gene analysis. In this study, the UBB7 isolate was purified and rejuvenated, before being discovered its antibacterial activity and Gram-stained color. To identify the species, the DNA of UBB7 isolate was extracted and amplified its 16S rRNA gene using Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Furthermore, the isolate sample underwent an electrophoresis process to determine the PCR results, before being proceeded to sequencing and phylogenetic analysis. The Gram-staining results showed that the UBB7 isolate is Gram-positive and cocci-shaped bacteria. When proliferated together with two pathogenic bacteria through disk diffusion method, the UBB7 isolate has stronger antibacterial properties to *Streptococcus agalactiae* than to *Aeromonas hydrophila* (inhibition zones of 16.2 mm vs 14.1 mm). After DNA extraction results, the UBB7 isolate showed a good DNA purity level at 1.98 (wavelength/ λ = 260/280) and 3.72 (λ = 260/230). The amplified 16S rRNA gene of UBB7 isolate has a length of 1412 base pairs (bp). The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) results indicate that the UBB7 isolate is identified as *Lactococcus cremoris* strain 4136. These bacteria can further be applied as probiotics, if widely studied in the future for aquaculture industries.

Keyword: Keanekaragaman, Makroalga, Zona intertidal, *Systematic sampling*

1. Pendahuluan

Ikan beong (*Hemibagrus nemurus*) merupakan spesies ikan endemik yang hidup di perairan tawar serta sungai yang memiliki distribusi yang cukup luas di Indonesia, yaitu meliputi Pulau Jawa, Kalimantan, dan Sumatera (Yuanawati et al., 2022). Menurut (Hardjamulia & Suhenda, 2017) ikan beong memiliki potensi yang baik untuk dipasarkan karena mempunyai nilai jual yang tinggi baik pada tingkat benih maupun sebagai ikan konsumsi. Hal tersebut juga didukung oleh pernyataan (Widayanti et al., 2021) yang mengungkapkan bahwa, ikan beong banyak dikonsumsi karena mengandung nutrisi tinggi seperti sumber protein, lemak (dengan sejumlah besar omega-3, omega-6, asam lemak tak jenuh tunggal, (asam *docosahexaenoic*, dan asam *eicosapentaenoic*), mineral, albumin, dan antioksidan. Produksi ikan baung di Indonesia pada tahun 2023 mencapai 31.821 ton (KKP, 2024)

Distribusi ikan beong di wilayah Jawa hanya ditemukan di Sungai Progo, Magelang. Ikan beong di daerah Magelang dimanfaatkan sebagai bahan kuliner khas yang terkenal yaitu olahan ikan mangut beong. Ikan beong memiliki cita rasa yang unik dengan daging yang padat sedikit tulang, rasa yang lembut dan harga pasarnya yang lebih mahal dibandingkan spesies ikan jenis *catfish* lainnya (Hasan et al., 2021). Namun, sebagian besar ikan beong masih mengandalkan tangkapan alam liar (Faizati et al., 2021). Ikan beong berhasil dibudidayakan di Dinas Peternakan dan Perikanan Kabupaten Magelang yang telah berhasil melalui pemijahan di UPTD Pembenihan Ikan Air Tawar (PIAT) Sawangan. Masih sedikitnya pembudidayaan ikan beong dikarenakan ikan beong memiliki pertumbuhan yang lambat dengan sifat kanibalisme, pemijahan yang masih sulit, mudah stres dan sensitif terhadap kualitas air.

Permasalahan budidaya ikan yang disebabkan oleh kualitas air adalah penyakit, terutama penyakit infeksius seperti penyakit bakterial. Penyakit bakterial yang biasa menyerang jenis ikan *catfish* air tawar diantaranya adalah *Motil Aeromonas Septicemia* (MAS) yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* dan penyakit *Streptococcosis* yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus agalactiae* (Wei et al., 2024). Hal tersebut tidak menutup kemungkinan bakteri tersebut dapat menyerang ikan beong. Menurut (Muslikha et al., 2016) bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri yang dapat menyebabkan kematian ikan dalam waktu yang sangat singkat hingga mencapai 80-100% dengan ditandai pendarahan di bagian dada, perut, dan pangkal sirip (Yuhana et al., 2008). Bakteri *S. agalactiae* menyebabkan penyakit *Streptococcosis* menyebabkan tingkat kematian pada ikan hingga 30- 50% (Eldar et al., 1995).

Sebagai ikan konsumsi, pengobatan penyakit bakterial pada ikan beong dengan menggunakan antibiotik dapat menyisakan residu pada tubuh ikan sehingga tidak aman ketika dikonsumsi oleh manusia. Selain itu, pemakaian antibiotik sebagai obat utama dalam penanganan suatu penyakit akan menimbulkan resistensi dari bakteri patogen (Wahjuningrum et al., 2008). Hal ini dibuktikan pada penelitian (Perkasa et al., 2019) yang menyatakan bahwa bakteri *A. hydrophila* dan *S. agalactiae* memiliki sifat resisten terhadap antibiotik yaitu *Novobiocin*, *Levofloxacin* dan *Ciprofloxacin*. Oleh karena hal tersebut, diperlukan alternatif pencegahan penyakit bakterial melalui pemberian probiotik. Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang cukup, dapat memberikan manfaat kesehatan pada inang (Hill et al., 2014). Probiotik untuk ikan berfungsi untuk meningkatkan efisiensi pakan dengan mengatur lingkungan mikroba usus, menghambat mikroorganisme patogen enterik, dan melepaskan enzim yang membantu proses pencernaan (Arief & Subekti, 2014). Mayoritas probiotik berasal dari bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat dapat ditemukan di saluran pencernaan ikan beong. Salah satu syarat wajib probiotik adalah diketahui jenis spesiesnya.

Penelitian sebelumnya telah berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri asam laktat (BAL) isolat UBB7. Isolat tersebut sudah terkonfirmasi sebagai BAL berdasarkan uji penumbuhan pada MRS, pewarnaan Gram, uji katalase, uji sensitivitas dan memiliki potensi antimikroba terhadap pertumbuhan bakteri patogen *S. agalactiae* (Larasati, 2024), namun sejauh ini spesies isolat UBB7 belum diketahui. Oleh karena itu, penelitian ini perlu dilakukan identifikasi spesies isolat BAL UBB7. Sejalan dengan perkembangan ilmu dan teknologi, beberapa metode telah tersedia untuk mengidentifikasi spesies bakteri, salah satu metode yang biasa digunakan adalah identifikasi spesies berdasarkan analisis gen 16S rRNA. Analisis gen 16S rRNA telah banyak digunakan untuk mendeteksi dan mengkaji keragaman genetik kelompok bakteri pada suatu habitat (Drancourt et al., 2000). Berdasarkan uraian diatas, maka penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi secara molekuler isolat UBB7 hingga taraf spesies berdasarkan analisis gen 16S rRNA untuk memperkuat kriteria penilaian sebagai kandidat probiotik unggul

2. Metode

2.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Unit Pelaksana Akademik (UPA) Taman Agroteknologi Universitas Tidar. Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2024 sampai dengan Desember 2024. Sampel isolat bakteri asam laktat (BAL) diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya (Liana et al., 2021).

2.2. Metode Pengambilan Data

Metode pengambilan data pada penelitian ini berupa pemurnian BAL, uji aktivitas antibakteri BAL terhadap bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*, & *Streptococcus agalactiae*, uji pewarnaan Gram, isolasi/ekstraksi DNA, amplifikasi/PCR, elektroforesis, sekuensing dan analisis filogenetik

2.3. Analisis Data

Data daya hambat bakteri asam laktat terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Streptococcus agalactiae* dianalisis menggunakan SPSS. Data yang diuji menggunakan SPSS berupa uji normalitas Shapiro-Wilk untuk mengetahui normalitas suatu data, setelah itu dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan isolat BAL yang diberikan terhadap zona hambat yang terbentuk pada bakteri *A. hydrophila* dan *S. agalactiae*. Apabila terdapat perbedaan nyata antar perlakuan maka dilakukan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) untuk membandingkan atau melihat beda nyata dari setiap perlakuan yang diberikan (Falakh & Astri, 2022). Data sekuens yang sudah dilakukan sekuensing oleh PT. Genetica Science Indonesia (GSI) kemudian disejajarkan dengan sekuens-sukuens referensi menggunakan *Clustal W Multiple Alignment* untuk membuat pohon filogenetik. Konstruksi pohon filogenetik dibuat menggunakan aplikasi perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 11.0 dengan metode *Neighbor-Joining* dan nilai bootstrap 1000.

3. Hasil dan Pembahasan

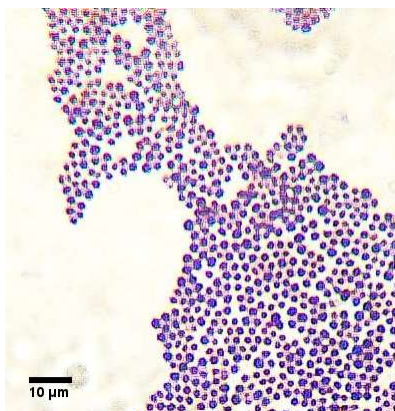
3.1. Hasil Pemurnian dan Pewarnaan Gram Bakteri Asam Laktat UBB7

Hasil biakan pemurnian menunjukkan koloni bakteri BAL UBB7 berbentuk *circular*, elevasi datar, tepian *entire*, ukuran kecil, warna putih dan permukaan halus. Hal ini sesuai dengan karakterisasi yang dilakukan oleh penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Liana et al., 2021). Menurut (Hamidah et al., 2019) sebagian besar koloni bakteri asam laktat berwarna putih dan bundar. Hal ini sesuai dengan pemurnian bakteri yang dihasilkan. Bentuk sebagian besar tepi koloni utuh dan struktur internalnya buram. Hampir 70% koloni bakteri asam laktat berwarna putih susu. Sebagian besar bentuk koloni berbentuk lingkaran sementara yang lain melengkung atau ikal. Pemurnian akan menghasilkan bentuk koloni yang seragam dimana mayoritas berbentuk bulat dan berwarna putih susu (Hamidah et al., 2019). Menurut (Dewi Safrida et al., 2012), isolasi dan karakterisasi suatu bakteri yaitu morfologi sel (bentuk sel dan susunan sel) merupakan tahap penting untuk identifikasi. Isolat yang memiliki kesamaan-kesamaan morfologi sel menunjukkan bakteri tersebut termasuk genera yang sama.



Gambar 1. Hasil koloni isolat BAL UBB7 asal pencernaan ikan beong pada media MRSA umur 24 jam

Pengamatan pewarnaan Gram dilakukan pada koloni murni BAL isolat UBB7 yang sudah diinokulasi di media MRSA agar miring. Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengamati BAL secara karakteristik mikroskopis, jenis Gram (positif atau negatif) dan penataan sel. Hasil pengamatan jenis Gram dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Hasil pewarnaan Gram isolat UBB7 menunjukkan Gram positif pada perbesaran 100×

Berdasarkan Gambar 2, hasil pengamatan mikroskopis dari BAL isolat UBB7 menunjukkan bahwa BAL isolat UBB7 berwarna ungu yang artinya bakteri BAL isolat UBB7 merupakan bakteri Gram positif dengan bentuk bulat (kokus). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh (Liana et al., 2021) bahwa bakteri isolat BAL UBB7 berwarna ungu, bersifat Gram positif dan berbentuk kokus. (Ismail et al., 2017) menyatakan, bahwa bakteri asam laktat tergolong bakteri Gram positif. Menurut (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014), bakteri asam laktat termasuk ke dalam bakteri Gram positif yang memiliki dinding peptidoglikan lebih tebal dari bakteri Gram negatif. Dinding peptidoglikan tersusun dari ikatan silang polisakarida oleh peptida. Ikatan inilah yang dapat mempertahankan warna dari kristal violet. Dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari makromolekul kompleks yaitu terdiri dari peptidoglikan mengelilingi membran sitoplasma, terdiri dari glikopolimer lain seperti asam teikoat atau polisakarida dan protein.

Uji Aktivitas Antibakteri Isolat UBB7 terhadap Streptococcus agalactiae dan Aeromonas hydrophila

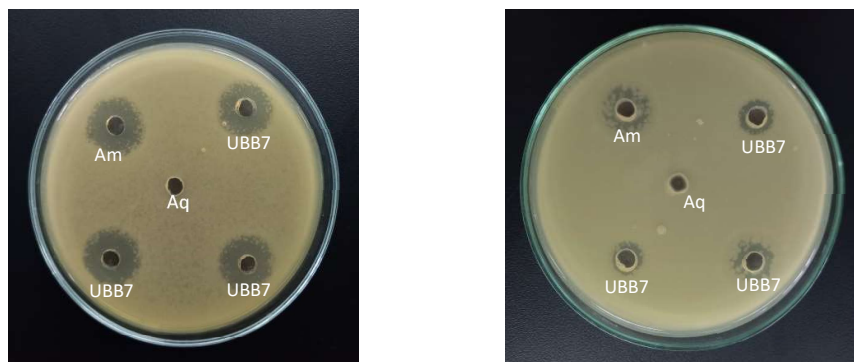
Hasil uji aktivitas antibakteri bakteri asam laktat terhadap bakteri *Streptococcus agalactiae* dan *Aeromonas hydrophila* dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Pengukuran zona hambat dan indeks penghambatan BAL terhadap bakteri *Streptococcus agalactiae* & *Aeromonas hydrophila*

Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)		Respon Hambatan
	Diameter Zona Bening	Indeks Penghambatan (IP)	
<i>S. agalactiae</i> (P1)	16,20 ± 2,25 ^b	1,69 ± 0,37 ^b	Kuat
<i>A. hydrophila</i> (P2)	14,10 ± 1,14 ^c	1,34 ± 0,18 ^c	Kuat
Amoksisilin (K+)	22,70 ± 1,3 ^a	2,78 ± 0,21 ^a	Kuat
Akuades (K-)	0,00 ± 0,00 ^d	0,00 ± 0,00 ^d	Lemah

Ket : P1 untuk *Streptococcus agalactiae*, P2 untuk *Aeromonas hydrophila*, K+ untuk antibiotik amoksisilin, dan K- = akuades steril, D sumur= 6 mm

Berdasarkan perhitungan uji hambat pada Tabel 1 dihasilkan bahwa isolat BAL UBB7 memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri *S. agalactiae*. Nilai rata-rata diameter zona bening menunjukkan, bahwa respon penghambatan pada aktivitas antibakteri BAL isolat UBB7 terhadap perlakuan bakteri *S. agalactiae* memiliki kemampuan penghambatan tinggi terhadap pertumbuhan bakteri patogen. Zona hambat BAL isolat UBB7 yang terbentuk pada sumuran agar terhadap bakteri *S. agalactiae* digolongkan dalam kategori kuat untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. agalactiae* yaitu memiliki rata-rata sebesar 16,2 mm. Hasil ini sesuai dengan penelitian (Rosari, 2014) yang menyatakan bahwa *S. agalactiae* adalah bakteri Gram positif yang paling sensitif terhadap antimikroba BAL, jika dibandingkan dengan *A. hydrophila*. Uji aktivitas antibakteri isolat BAL UBB7 terhadap bakteri *A. hydrophila* memiliki nilai respon penghambatan sedang dibandingkan dengan bakteri *S. agalactiae*. Hal tersebut dibuktikan dengan nilai zona hambat isolat BAL UBB7 terhadap bakteri *A. hydrophila* memiliki nilai rata-rata 14,1 mm ± 1,14 mm dengan respon penghambatan sedang. Gambar hasil uji aktivitas antibakteri BAL isolat UBB7 terhadap bakteri *S. agalactiae* dapat dilihat pada **Gambar 3**.



Perlakuan Bakteri *S. agalactiae*

Perlakuan Bakteri *A. hydrophila*

Gambar 3. Hasil pengujian uji aktivitas antibakteri bakteri asam laktat terhadap bakteri *S. agalactiae* dan *A. hydrophila* pada media TSA umur 48 jam

Ket : Am untuk antibiotik amoksisilin (Kontrol positif) , Aq untuk akuades steril (Kontrol negatif)

Zona hambat terbentuk karena adanya interaksi antara isolat bakteri asam laktat yang mendesak pertumbuhan bakteri patogen. Perbedaan aktivitas hambat kemungkinan karena adanya perbedaan metabolisme glukosa yang dihasilkan bakteri asam laktat, ada yang bersifat homofermentatif dan heterofermentatif, serta sifat bakteriosin yang hanya mampu menghambat bakteri tertentu. Perbedaan dari zona hambat yang dihasilkan antara isolat bakteri asam laktat dari masing-masing isolat dalam menghambat bakteri patogen diduga disebabkan oleh perbedaan senyawa aktif yang dihasilkan (Jaya et al., 2023).

Senyawa yang dihasilkan berupa senyawa aktif atau enzim hidrolitik yang saling berinteraksi. Bakteri asam laktat diketahui memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa bioaktif berupa enzim hidrolitik yang dapat mendegradasi dan merusak komponen struktur dinding sel dari bakteri patogen (Riadi et al., 2017). Beberapa hal yang dapat mempengaruhi besar dan kecilnya zona hambat yang dibentuk oleh isolat bakteri asam laktat terhadap bakteri patogen antara lain adalah interaksi antara kemampuan bakteri asam laktat dalam

menghasilkan senyawa aktif atau enzim hidrolitik, umur biakan bakteri, jumlah senyawa aktif yang dihasilkan, komposisi medium dan waktu inkubasi (Riadi et al., 2017).

Berdasarkan data diatas bahwa daya hambat BAL isolat UBB7 terhadap *S. agalactiae* lebih besar daripada *A. hydrophila*. Hal ini karena *A. hydrophila* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki sifat kurang sensitif terhadap komponen antibakteri. Struktur penyusun dinding sel bakteri Gram negatif lebih kompleks dan berlapis tiga, yaitu lapisan luar berupa lipoprotein, lapisan tengah berupa peptidoglikan dan lapisan dalam lipopolisakarida sehingga mempersulit senyawa antibakteri masuk kedalam selnya dan menyebabkan zona bening yang dihasilkan lebih kecil dibandingkan dengan zona bening yang dihasilkan oleh *S. agalactiae* yang merupakan bakteri Gram positif. Bakteri *A. hydrophila* juga memiliki sistem AheABC pada pompa efflux. Mekanisme pompa efflux yang digunakan oleh bakteri *A. hydrophila* adalah untuk mengeluarkan berbagai molekul dari dalam selnya, termasuk antibiotik, racun, dan produk sampingan metabolik. Pompa efflux ini berperan penting dalam meningkatkan ketahanan bakteri terhadap berbagai senyawa yang dapat merusak atau menghambat pertumbuhannya, seperti antibiotik. Keberadaan dan aktivitas pompa efflux pada *A. hydrophila* berhubungan dengan fenomena resistensi terhadap senyawa antibiotik (Rosari, 2014).

Berdasarkan hasil diameter zona bening terhadap bakteri *S. agalactiae* lebih lebar hal ini dikarenakan BAL mampu menghasilkan asam laktat dalam jumlah besar, sehingga mampu menghambat pertumbuhan *S. agalactiae* pada kondisi yang sangat asam, meskipun bakteri *S. agalactiae* lebih tahan terhadap lingkungan asam dibandingkan banyak bakteri patogen lainnya. Bakteriosin yang lebih kuat atau lebih spesifik terhadap *S. agalactiae* dapat menyebabkan penghambatan pertumbuhan yang signifikan jika bakteri ini tidak dapat menghindari atau menetralkan efek bakteriosin dari BAL tersebut. Kompetisi untuk sumber daya dan pembentukan biofilm juga berperan penting dalam meningkatkan kelangsungan hidup bakteri ini dalam lingkungan yang penuh dengan BAL, namun pembentukan biofilm itu sendiri bisa menjadi kelemahan bakteri *S. agalactiae* dalam menghadapi BAL (Riadi et al., 2017; Belinda et al., 2021).

Biofilm dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang lebih dominan di lingkungan mikroba yang penuh dengan BAL, karena komposisi biofilm yang sangat spesifik dan terbatas pada koloni bakteri tertentu (Ismail et al., 2017). Membran sel bakteri Gram-positif seperti *S. agalactiae* juga berperan sebagai penghalang terhadap senyawa-senyawa yang dapat merusak sel, termasuk senyawa antibiotik, namun bakteri *S. agalactiae* relatif sensitif terhadap banyak senyawa antibiotik, sehingga diameter BAL terhadap bakteri *S. agalactiae* lebih lebar.

Hasil pengujian dari perlakuan BAL UBB7 terhadap bakteri *Streptococcus agalactiae* dan *Aeromonas hydrophila* menunjukkan hasil penghambatan yang berbeda. Hal ini didasarkan pada analisis data kuantitatif secara statistik menggunakan Shapiro-Wilk test p-value. Hasil uji normalitas data diameter zona hambat menunjukkan bahwa diameter zona hambat pada Perlakuan 1 (*Streptococcus agalactiae*), perlakuan 2 (*Aeromonas hydrophila*), perlakuan 3 (amoksisilin) data terdistribusi normal. Kemudian, dilakukan uji One-way ANOVA pada zona hambat dan didapatkan hasil signifikansi sebesar 0,006 dimana yang berarti H1 diterima atau terdapat perbedaan rata-rata antar perlakuan pada penelitian ini.

Uji lanjut yang digunakan adalah uji Duncan. Uji Duncan digunakan untuk melihat perlakuan mana yang memiliki efek yang sama atau berbeda dan efek yang terkecil sampai efek yang terbesar antara satu dengan lainnya. Uji Duncan terhadap diameter zona hambat BAL UBB7 dengan nilai tertinggi diperoleh pada perlakuan 2 yaitu perlakuan bakteri *S. agalactiae* dengan nilai 16,2 mm, nilai tertinggi kedua diperoleh pada perlakuan bakteri *A. hydrophila* dengan nilai 14,1 mm sedangkan nilai terendah pada perlakuan kontrol negatif (akuades). Hal ini menunjukkan bahwa BAL UBB7 tersebut telah menunjukkan efek yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. agalactiae* dan bakteri *A. hydrophila*. Kontrol negatif yang digunakan adalah akuades yang menunjukkan tidak adanya zona hambat. Hal ini mengindikasikan bahwa kontrol yang digunakan tidak berpengaruh pada uji antibakteri.

Kontrol positif yaitu antibiotik amoksisilin 200 ppm menunjukkan perbedaan yang nyata dalam uji Duncan, karena menghasilkan aktivitas antibakteri yang paling besar terhadap bakteri uji dibandingkan dengan kontrol negatif dan berbagai konsentrasi ekstrak. Antibiotik yang digunakan sebagai pembanding atau kontrol positif adalah amoksisilin. Menurut (Anggraini et al., 2020) amoksisilin termasuk antibiotik yang berspektrum luas dan bersifat bakterisidal (membunuh bakteri) pada bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen lebih besar.

Ekstraksi DNA Genom isolat UBB7

Berdasarkan hasil ekstraksi konsentrasi DNA yang diperoleh dari isolat BAL UBB7 sebesar 45,5 ng/μl. Kemurnian DNA pada panjang gelombang 260/280 yang diperoleh dari isolat BAL UBB7 sebesar 1,98, sedangkan kemurnian DNA pada panjang gelombang 260/230 adalah 3,72. Menurut (Clarridge, 2004) nilai 260 nm merupakan nilai maksimal DNA dapat menyerap cahaya, nilai tersebut dapat digunakan untuk

memperkirakan konsentrasi DNA, sedangkan nilai 280 nm merupakan nilai maksimal residu protein dapat menyerap cahaya.

Nilai kemurnian isolat BAL UBB7 pada A260/A280 tergolong pada nilai kemurnian DNA yang berkualitas dimana hal ini sesuai dengan pernyataan (Aminah et al., 2019) bahwa konsentrasi DNA dikatakan baik jika DNA yang diisolasi memiliki konsentrasi di atas 20, dengan nilai kemurnian dari ekstrak DNA berkisar antara 1,8-2,1, sedangkan menurut (Sophian, 2021) nilai kemurnian di bawah 1,8, DNA yang diisolasi mungkin terkontaminasi protein, jika nilai kemurnian di atas 2,1 maka dapat diduga bahwa isolasi DNA yang dilakukan terkontaminasi RNA. Kualitas DNA yang dihasilkan dipengaruhi oleh faktor teknis selama pengerjaan ekstraksi, diantaranya yaitu faktor pemindahan supernatan yang mengandung DNA setelah diinkubasi ke dalam *microtube* yang baru dan pengeringan ekstrak harus dilakukan secara teliti supaya jaringan – jaringan yang telah hancur dan berada dibawah *microtube* tidak ikut terambil. Proses pengeringan DNA yang berupa pellet juga harus kering dari larutan sebelumnya dipakai untuk purifikasi (Belinda et al., 2021). Menurut (Dewanata & Mushlih, 2021) terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi hasil Spektrofotometer Nanodrop diantaranya adalah proses pipetasi atau transfer sampel isolasi dari *minitube* ke *pcrtube* sebelum dilakukan pemeriksaan Spektrofotometer Nanodrop. Faktor selanjutnya yaitu tingkat spesifisitas Spektrofotometer Nanodrop yang tidak terlalu tinggi karena pada Panjang gelombang 260 nm bukan hanya double strain DNA (dsDNA) yang dapat menyerap Panjang gelombang 260 nm namun juga jenis asam nukleat lain seperti single strain DNA (ssDNA) dan RNA.

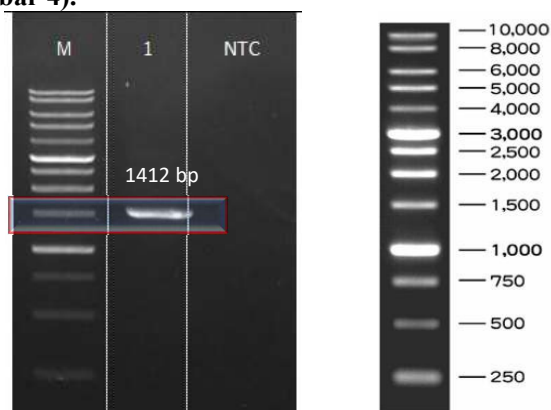
Hasil konsentrasi DNA (Tabel 2) menunjukkan hasil yang cukup baik yaitu 1,98 ug/ul. Pengamatan kualitas DNA dengan elektroforesis gel agarosa 0,8% berfungsi untuk mengetahui ada tidaknya DNA, keutuhan DNA hasil isolasi dan tingkat kemurnian DNA dari kontaminan RNA (Murtiyaningsih, 2017). Nilai rasio sekitar 1,8-2,0 ug/ul menunjukkan bahwa DNA cukup murni. Nilai yang lebih rendah mengindikasikan kontaminasi protein atau bahan lain yang mengganggu PCR. Berdasarkan Tabel (2) menunjukkan bahwa nilai rasio A230/A260 sebesar 1,98 ug/ul yang menunjukkan bahwa kualitas DNA *template* sudah terpenuhi.

Tabel 2. Hasil kuantifikasi DNA isolat UBB7

Nama Sampel	Kode Sampel	Konsentrasi (ng/ μ l)	A _{260/280}	A _{260/230}	Vol (μ l)
UBB7	G-3564-1	45,5	1,98	3,72	40

Elektroforesis Visualisasi Pita DNA Isolat UBB7

Amplifikasi dilakukan menggunakan primer yang menargetkan wilayah konservatif pada gen 16S rRNA yang berdekatan dengan wilayah hipervariabel, yaitu menggunakan primer *forward* 27F (5'–AGAGTTTGATCMTGGCTCAG– 3') dan 10 μ M primer *reverse* 1492R (5'–TACGGYTACCTTGTACGACTT– 3'). Hasil amplifikasi gen 16S rRNA isolat UBB7 dilakukan konfrimasi hasil dengan visualisasi DNA dengan metode elektroforesis. Hasil visualisasi DNA dengan gen 16S rRNA dari isolat UBB7 dapat dilihat dengan munculnya fragmen produk PCR dengan ukuran 1412 *base pairs* (bp) yang merupakan ukuran yang diharapkan dengan menggunakan kombinasi primer *kit MyTaq HS Red Mix, 2X* (Bioline, BIO-25048) (**Gambar 4**).



Gambar 4. Visualisasi gen 16S rRNA isolat UBB7

Ket: M = Marker 1, NTC = *Non Template Control*

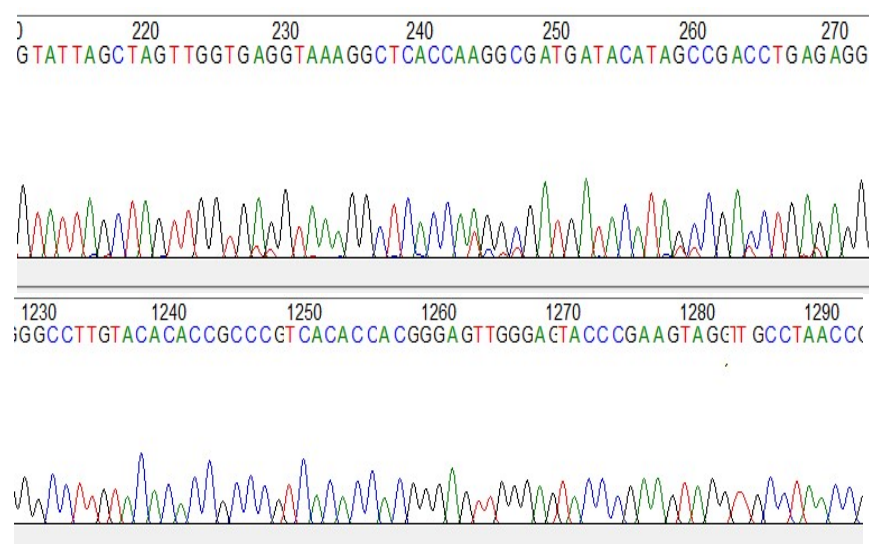
Produk *Polymerase Chain Reaction* (PCR) isolat BAL UBB7 1 μ L produk amplifikasi di visualisasi pada gel agarose 0,8% dalam buffer TBE. Berdasarkan hasil elektroforegram amplifikasi gen 16S rRNA

marker 1 kb DNA *ladder* (dalam 2,5 µl) diperoleh hasil amplikon dengan panjang 1412 bp. Hasil elektroforesis diketahui terdapat pita yang terseparasi dan sejajar dengan marka 1412 bp (Gambar 13). Hal ini menandakan bahwa fragmen gen isolat BAL UBB7 yang teramplifikasi memiliki panjang 1412 *basepair* (bp) dengan ditunjukkan pada pita tebal yang terbentuk pada marker DNA.

Jumlah panjang ~1412 bp menunjukkan panjang gen yang sedikit lebih pendek daripada rata-rata panjang gen 16S rRNA pada kebanyakan bakteri, yang biasanya berkisar antara 1400 hingga 1.550 bp (Melzana et al., 2021). Namun, perbedaan panjang ini tetap dalam rentang yang dapat diterima, karena panjang gen 16S rRNA dapat bervariasi antar spesies atau bahkan antar strain dalam spesies yang sama. Hal ini menjelaskan bahwa gen 16S rRNA berukuran panjang antara 1400 hingga 1550 bp, namun panjang ini dapat sedikit bervariasi antar spesies, tetapi biasanya berada di rentang 1400-1550 bp yang disebabkan pada daerah hipervariabel memiliki panjang yang berbeda-beda. Menurut (Noer, 2021) daerah hipervariabel V1 hingga V3 merupakan daerah yang lebih sering digunakan untuk analisis taksonomi dan identifikasi spesies dalam komunitas bakteri yang lebih luas. Daerah ini cukup baik dalam membedakan bakteri asam laktat berbagai spesies dalam genus *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, dan kelompok bakteri asam laktat lainnya. Wilayah V1 dan V2 mengandung informasi yang cukup baik untuk membedakan genus, sedangkan V3 sering digunakan untuk membedakan spesies dalam genus yang sama.

Sekuensing dan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Elektroforegram yang dihasilkan dalam bentuk peak yang berwarna-warni dengan nukleotida A (Adenin) berwarna hijau, nukleotida G (Guanin) berwarna hitam, nukleotida C (sitosisin) berwarna biru dan nukleotida T (timin) berwarna merah. Menurut (Rangian et al., 2018) elektroforegram adalah representasi grafik dari hasil pemisahan komponen-komponen dalam sampel berdasarkan waktu atau volume elusi, dengan intensitas sinyal pada sumbu y dan waktu atau volume pada sumbu x. Elektroforegram yang baik adalah hasil analisis kromatografi yang menunjukkan pemisahan yang jelas, tajam, dan terpisah dengan baik dengan untaian satu lembah dan satu bukit antara komponen-komponen dalam sampel yang dianalisis (Pangemanan et al., 2019) Berdasarkan hasil elektroforegram pada isolat BAL UBB7 terlihat bahwa bentuk elektroforegram sedikit kurang sempurna atau seragam dimana kromatogram masih terdapat lembah yang tumpang tindih, terlalu tinggi maupun terlalu pendek. Hal ini juga menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi panjang basepair bakteri isolat BAL UBB7 hanya mencapai 1412 bp. Hasil kromatogram selanjutnya dilakukan pengeditan dengan menggunakan aplikasi MEGA 11.0 untuk mendapatkan sekuens yang baik untuk memudahkan proses pembacaan dengan menggunakan sistem BLAST. Hasil sekuensing dilihat menggunakan aplikasi MEGA 11.0 dan menghasilkan data urutan nukleotida yang diperoleh dalam bentuk format elektroforegram *forward* dan *reverse* (Gambar 5).



Gambar 5. Hasil elektroforegram pengurutan DNA isolat BAL UBB7 menggunakan primer *Forward* & *Reverse*

Pembacaan menggunakan sistem BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dilakukan melalui website NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) secara online. Pembacaan hasil sekuensing pada sistem BLAST akan menunjukkan kemiripan dengan beberapa sekuen yang terdaftar pada Gen Bank,

sehingga perlu dilakukan pembuatan pohon filogenetik untuk mengetahui tingkat kekerabatannya. Hasil sekuensing amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan menggunakan primer *kit MyTaq HS Red Mix, 2X* (Bioline, BIO-25048). Hasil BLAST menunjukkan BAL isolat UBB7 memiliki homologi (kemiripan) dengan *Lactococcus cremoris* strain 4136, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain DR2, *Lactococcus cremoris* strain 3940, *Lactococcus cremoris* strain 3941, *Lactococcus cremoris* strain MG5136, *Lactococcus cremoris* Flora aid, dan *Lactococcus cremoris* strain RU36-7 yang memiliki nilai *percentage indent* sebesar 99,72% (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil BLAST isolat BAL UBB7

<i>Species</i>	<i>Query cover</i>	<i>Per. Indent</i>	<i>Accession Number</i>
Isolat BAL UBB7			
<i>Lactococcus cremoris</i> strain 4136	100%	99,72%	MTT544710.1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strain DR2	100%	99,72%	JQ680418
<i>Lactococcus cremoris</i> strain 3940	100%	99,72%	MT538775.1
<i>Lactococcus cremoris</i> strain 3941	100%	99,72%	MT538776.1
<i>Lactococcus cremoris</i> strain MG5136	100%	99,72%	MN339972.1
<i>Lactococcus cremoris</i> Flora aid	100%	99,72%	LC799798.1
<i>Lactococcus cremoris</i> strain RU36-7	100%	99,72%	KC836714.1
<i>Lactobacillus</i> sp. strain LZ-R-12	100%	98,94%	MH236786.1
<i>Lactobacillus</i> sp. strain sep1	99%	99,01%	MG543795.1
<i>Lactobacillus</i> sp. strain CAU9935	99%	98,93%	MF098140.1
<i>Lactobacillus delbruceckii</i> subsp. <i>lactis</i> strain M17A	100%	98,17%	MH813978.1

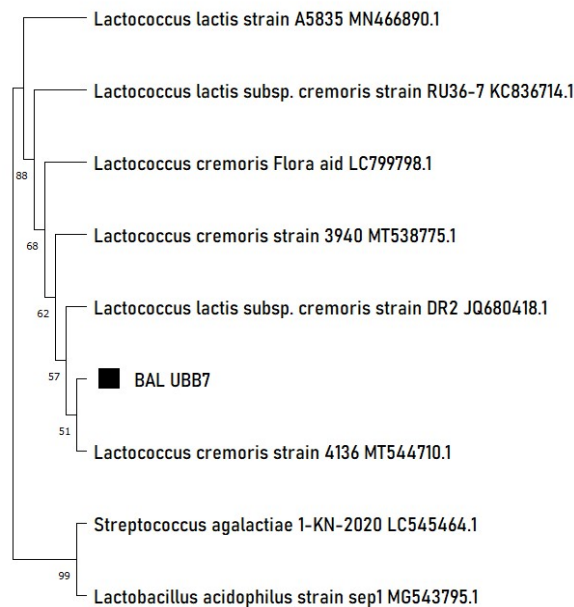
Hasil identifikasi yang dilakukan menunjukkan bahwa isolat BAL UBB7 teridentifikasi memiliki tingkat kemiripan tertinggi dengan spesies *Lactococcus cremoris* strain 4136. Menurut (Widyasari, D. Eko Sugeng Priyadi, D. E., Pasribu, F. H. Septiningtyas, W., Adiputra, 2020) *query cover* merupakan nilai angka yang menjelaskan jumlah sekuen contoh yang tercakup dalam urutan target. Jika sekuens target dalam basis data mencakup seluruh sekuens contoh yang diperiksa, maka angka *query cover* adalah 100%. Hasil *query cover* isolat BAL UBB7 menunjukkan nilai 100% dengan spesies *Lactococcus cremoris* strain 4136. Menurut (Nugraha et al., 2014) *percentage indent* merupakan persentase keakuratan identifikasi, *query cover* merupakan persentase sampel yang terpakai di dalam analisis BLASTn, sedangkan *accession number* merupakan nomor akses atau penomoran khusus bagi tiap record. Nilai *Percentage indent* isolat BAL UBB7 menunjukkan nilai sebesar 99,72% dengan spesies *Lactococcus cremoris* yang memiliki *accession number* MTT544710.1.

Analisis Pohon Filogenetik Berdasarkan Isolat UBB7

Hasil BLAST yang diperoleh selanjutnya dibuat menjadi pohon filogenetik menggunakan perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 11.0 menggunakan metode *Neighbor-Joining* dan nilai *bootstrap* 1000 untuk mengetahui kekerabatan terdekat dari setiap spesies yang dihasilkan (Gambar 6).

Menurut (Islami et al., 2019) jika kemiripan dengan data yang terdapat pada sekuens database besar 97-100% dinyatakan sebagai hasil yang signifikan, sementara kemiripan sebesar 92-96% dinyatakan sebagai hasil yang cukup, sedangkan hasil kemiripan kurang dari 91% dinyatakan sebagai hasil yang tidak signifikan. Hasil tersebut juga didukung dengan visualisasi pada pohon filogenetik dan pengujian aktivitas antibakteri dan pewarnaan Gram. Nilai *bootstrap* menunjukkan kekerabatan yang dekat apabila memiliki nilai yang tinggi, yaitu lebih dari 70% atau di atas 70. (Petti, 2007), mengemukakan bahwa sebagian besar ahli taksonomi menerima skor identitas $\geq 97\%$ untuk mengklasifikasikan mikroorganisme ke dalam genus dan

spesies tertentu, kemudian kesamaan urutan dapat dinilai lebih lanjut dengan diagram keterkaitan (pohon filogenetik) yang memperkirakan jarak evolusi antara urutan.



Gambar 6. Pohon filogenetik *Neighbor-Joining* yang dihasilkan berdasarkan sekuen Gen 16S rRNA isolat UBB.

Bakteri *Lactococcus cremoris* adalah bakteri Gram positif, tidak memiliki flagel, tidak membentuk spora, bersifat anaerob fakultatif, katalase negatif dan non-hemolitik sesuai dengan pengujian biokimia pada penelitian sebelumnya (Liana et al., 2021). Klasifikasi bakteri *L. cremoris* menurut (Mou et al., 2020) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria
Phylum : Bacillota
Class : Bacilli
Order : Lactobacillales
Family : Streptococcaceae
Genus : *Lactococcus*
Species : *Lactococcus cremoris*

Bakteri *L. cremoris* tumbuh pada suhu 10°C, tetapi tidak mampu bertahan pada suhu 45°C. *L. cremoris* dapat ditemukan secara luas pada jenis makanan seperti daging fermentasi, sayuran fermentasi, buah, limbah, rumput, saluran genital, usus dan saluran pencernaan manusia atau hewan (Mou et al., 2020). *L. cremoris* pada saluran pencernaan hewan terutama ikan masih sedikit ditemukan. Keberadaan *L. cremoris* pada saluran pencernaan hewan bersifat tidak disengaja karena mereka biasanya tidak ditemukan dalam jumlah yang signifikan dalam kotoran atau tanah. Menurut (Hamidah et al., 2019) keberadaan bakteri asam laktat pada sistem pencernaan ikan dipengaruhi oleh kebiasaan makan ikan. Hal yang berpengaruh adalah jenis makanan, baik yang tersedia secara alami di lingkungan perairan terkait dengan perubahan musim, maupun penambahan bahan tertentu di dalam pakan pada kegiatan budidaya ikan (Hoseinifar et al., 2016).

L. cremoris memiliki genom yang sangat fleksibel untuk beradaptasi di berbagai lingkungan karena memiliki tingkat keragaman yang tinggi dalam hal sifat fungsional, struktural, dan metabolisme, sehingga tidak menutup kemungkinan bahwa *L. cremoris* dapat ditemukan pada saluran pencernaan ikan. Hal ini dibuktikan pada penelitian (Kato et al., 2016) yang melaporkan bahwa *Lactococcus* spp. merupakan spesies bakteri asam laktat yang paling dominan menempati saluran pencernaan ikan pebbly (*Alestes baremoze*).

Salah satu kriteria terpenting untuk probiotik adalah kemampuannya untuk menghambat aktivitas bakteri patogen yang dapat menginfeksi saluran pencernaan (Srifani et al., 2024). Kemampuan antimikroba terhadap patogen merupakan parameter yang harus diuji ketika memilih strain probiotik. Aktivitas antimikroba mikroorganisme probiotik terhadap patogen berperan dalam menjaga keseimbangan mikroflora usus dan melindungi usus dari patogen. Hasil penelitian (Kato et al., 2016) juga melaporkan bahwa *Lactococcus* spp. dari saluran pencernaan ikan pebbly (*Alestes baremoze*) memiliki aktivitas antimikroba dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* (zona hambat 6±0,17), *Echericia coli* (zona hambat

7±0,10) dan *Proteus* spp. (3,5±0,10). Potensi probiotik pada bakteri *L. cremoris* lain dibuktikan pada penelitian (Contente et al., 2023) yang menyatakan bahwa *L. cremoris* mampu merangsang sistem imun dan memperkuat respons imun alami terhadap infeksi dan stres lingkungan pada ikan salmon pelangi.

Sejauh ini belum terdapat laporan penelitian mengenai aplikasi bakteri *L. cremoris* pada industri perikanan, namun berdasarkan hasil pengujian telah dibuktikan bahwa bakteri *L. cremoris* mampu dijadikan kriteria sebagai probiotik. Hal ini membuktikan bahwa spesies *L. cremoris* berpotensi baik untuk dijadikan sebagai probiotik unggul dalam industri perikanan. Kemampuan probiotik untuk memperbaiki proses pencernaan ikan diantaranya berkaitan dengan kemampuan produksi enzim amilase, protease, lipase, dan selulase yang biasanya dimiliki oleh ikan (Istiqomah et al., 2019). Menurut (Hayati & Issn, 2012) enzim lipase, protease dan selulase dalam saluran pencernaan ikan sangat penting, karena berfungsi untuk memastikan bahwa ikan dapat memperoleh dan memanfaatkan nutrisi dari berbagai jenis makanan yang mereka konsumsi, baik itu karbohidrat, lemak, atau protein. *Lactococcus* juga memiliki aktivitas antibakterial dengan ditunjukkan oleh adanya aktivitas penghambatan yang kuat terhadap bakteri *Streptococcus agalactiae* dan *Aeromonas hydrophila* untuk menghambat patogen pada ikan nila serta ikan beong

4. Kesimpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa uji aktivitas antibakteri dengan BAL UBB7 memiliki kemampuan menghambat bakteri patogen *Streptococcus agalactiae* dan *Aeromonas hydrophila* dengan respon penghambatan kuat, zona hambatan 16,2 mm (kuat), zona hambatan 14,1 mm (kuat), dengan hasil P1 (*Streptococcus agalactiae*) lebih kuat dari P2 (*Aeromonas hydrophila*). Hasil ekstraksi DNA isolat BAL UBB7 diperoleh kemurnian DNA (λ) 260/280 sebesar 1,98 dengan nilai kualitas kemurnian baik. Hasil fragmen gen isolat BAL UBB7 yang teramplifikasi memiliki panjang 1412 basepair (bp) dengan ditunjukkan pada pita tebal yang terbentuk pada marker DNA. Hasil Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) menunjukkan BAL isolat UBB7 memiliki homologi (kemiripan) dengan *Lactococcus cremoris* strain 4136 dengan nilai query cover 100%, percentage indent 99,72% dan accession number MTT544710.1. Nilai bootstrap pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat UBB7 memiliki nilai bootstrap sebesar 99% dekat dengan *Lactococcus cremoris* strain 4136

Daftar Pustaka

- Aminah, A., Ramadini, R., & Naid, T. (2019). Analisis Cemarkan DNA Tikus pada Bakso Daging Sapi yang Beredar di Makassar dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 5(1), 93–100. <https://doi.org/10.22487/j24428744.2019.v5.i1.12036>
- Anggraini, L. M., Sagita, D., & Pratama, S. (2020). Sensitivitas Kombinasi Antibakteri Amoksisilin dan Kotrimoksazol. *Journal of Healthcare Technology and Medicine*, 6(1), 294–300.
- Arief, & Subekti. (2014). Pengaruh pemberian probiotik berbeda pada pakan komersial terhadap pertumbuhan dan efisiensi pakan ikan lele sangkuriang (*Clarias* sp.). *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan*, 6(1), 5.
- Belinda, D. P., Fadli, M. Z., & Risandiansyah, R. (2021). Perbandingan Kualitas dan Kuantitas Ekstrak DNA *Staphylococcus aureus* Antara Al Kaline Lisis dan Kit Berbasis Filter. *Jurnal Bio Komplementer Medicine*, 8, 1–8.
- Chapot-Chartier, M. P., & Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9>
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Contente, D., Díaz-Rosales, P., Feito, J., Díaz-Formoso, L., Docando, F., Simón, R., Borrero, J., Hernández, P. E., Poeta, P., Muñoz-Atienza, E., Cintas, L. M., & Tafalla, C. (2023). Immunomodulatory effects of bacteriocinogenic and non-bacteriocinogenic *Lactococcus cremoris* of aquatic origin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Frontiers in Immunology*, 14(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1178462>
- Dewanata, P. A., & Mushlih, M. (2021). Differences in DNA Purity Test Using UV-Vis Spectrophotometer and Nanodrop Spectrophotometer in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Indonesian Journal of Innovation Studies*, 15, 1–10. <https://doi.org/10.21070/ijins.v15i.553>

- Dewi Safrida, Y., Yulvizar, C., & Nanda Devira, C. (2012). Isolasi dan karakterisasi bakteri berpotensi probiotik pada ikan kembung (*Rastrelliger* sp.). *Depik*, 1(3), 200–203. <https://doi.org/10.13170/depik.1.3.124>
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J. P., & Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3623–3630. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.10.3623-3630.2000>
- Eldar, A., Frelie, P. F., Assenta, L., Varner, P. W., Lawhon, S., & Bercovier, H. (1995). *Streptococcus shiloi*, the Name for an Agent Causing Septicemic Infection in Fish, Is a Junior Synonym of *Streptococcus iniae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(4), 840–842. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-840>
- Faizati, W., Hastuti, S., Nugroho, R. A., Yuniarti, T., Basuki, F., & Nurhayati, D. (2021). The Effects of Stocking Density on Growth and Survival rate of Beong (*Hemibagrus nemurus*). *Sains Akuakultur Tropis*, 5(2), 136–146. <https://doi.org/10.14710/sat.v5i2.3561>
- Falakh, F., & Astri, T. (2022). Uji Potensi Isolat Bakteri Asam Laktat dari Nira Siwalan (*Borassus flabellifer* L.) sebagai Antimikroba terhadap *Salmonella*. *Food Chemistry: X*, 18(1), 40–45.
- Jaya, G.I., Utami, S. N. U., Widada, J., Annisa Yusuf, W., Abbas, S., Fatturahman Ridwan, N., & Noviyanto, A. (2023). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pelarut Fosfat dari Tanah Rawa dengan Tingkat Kemasaman yang Tinggi. *Jurnal Pertanian*, 14(2), 102–110. <https://doi.org/10.30997/jp.v14i2.9932>
- Hamidah, M. N., Rianingsih, L., & Romadhon, R. (2019). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Peda Dengan Jenis Ikan Berbeda Terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*, 1(2), 11–21. <https://doi.org/10.14710/jitpi.2019.6742>
- Hardjamulia, A., & Suhenda, N. (2017). Evaluasi Sifat Reproduksi Dan Sifat Gelondongan Generasi Pertama Empat Strain Ikan Baung (*Mystus nemurus*) di Keramba Jaring Apung. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 6(3–4), 24. <https://doi.org/10.15578/jppi.6.3-4.2000.24-35>
- Hasan, B., Iriani, D., Sumarto, & Warningsih, T. (2021). Utilization of Fermented Salted Marine Trashfish Meal for Replacing Fishmeal in *Nemurus* Catfish (*Hemibagrus nemurus*) Diets. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 695(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/695/1/012054>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hoseinifar, S. H., Khalili, M., & Sun, Y. Z. (2016). Intestinal histomorphology, autochthonous microbiota and growth performance of the oscar (*Astronotus ocellatus* Agassiz, 1831) following dietary administration of xylooligosaccharide. *Journal of Applied Ichthyology*, 32(6), 1137–1141. <https://doi.org/10.1111/jai.13118>
- Islami, H. N., Sulistyningtyas, A. R., Darmawati, S., & Ethica, S. N. (2019). Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Proteolitik *Staphylococcus warneri* Strain IRLV2 pada Udang Putih (*Litopenaeus vannamei*) Berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA. *Prosiding Mahasiswa Seminar Nasional Unimus*, 2(1), 32–39.
- Ismail, Y. S., Yulvizar, C., & Putriani. (2017). Isolasi, karakterisasi dan uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat dari fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao* L.). *Bioleuser*, 1(2), 45–53.
- Istiqomah, I., Atitus, I. N., Rohman, A. F., & Isnansetyo, A. (2019). Isolation of Cellulolytic Bacterium *Staphylococcus* sp. JC20 from the Intestine of Octopus (*Octopus* sp.) for Fish Probiotic Candidate. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 21(2), 93. <https://doi.org/10.22146/jfs.39525>
- Kato, C., Mugaanyi, M., Majalija, S., Tamale, A., Musisi, N., & Sengooba, A. (2016). Isolation and Identification of Potential Probiotics Bacteria from the Gut of *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus* in Uganda. *British Microbiology Research Journal*, 17(5), 1–8. <https://doi.org/10.9734/bmrj/2016/29721>
- KKP [Kementerian Kelautan dan Perikanan]. 2024. Produksi Perikanan Budidaya Ikan di Indonesia [online]. <https://portaldata.kkp.go.id/portals/data-statistik/prod-ikan/summary>
- Liana, D., Wulan, R., Nofreana, A., Program, A. S., & City, M. (2021). Isolation of Probiotic Candidate Lactic Acid Bacteria from the Intestines of Beong Fish (*Hemibagrus nemurus*) to Control *Streptococcus agalactiae* Bacteria. 39.
- Melzana, I., Safika, S., Darmawi, D., Erina, E., Fakhurrazi, F., & Azhar, A. (2021). 12. Isolate Of Bacteriua Cellulase Enzyme Production In The Rumen Of Aceh Cattle Base On Analysis Homology 16S rRNA. *Jurnal Medika Veterinaria*, 14(2), 174–182. <https://doi.org/10.21157/j.med.vet.v14i2.3415>

- Mou, T. H., Ali, A., & Islam, M. (2020). *Jurnal Pertanian Turki - Ilmu dan Teknologi Pangan Taman Atas*, 8(1), 246–251.
- Murtiyaningsih, H. (2017). Isolasi DNA genom dan identifikasi kekerabatan genetik nanas menggunakan RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA). *Agritrop*, 15(1), 84–93.
- Muslikha, Pujiyanto, S., Jannah, S. N., & Novita, H. (2016). Isolasi, karakterisasi *Aeromonas hydrophila* dan deteksi gen penyebab penyakit motile aeromonas septicemia (MAS) dengan 16s rRNA dan aerolysin pada ikan lele (*Clarias sp.*). *Jurnal Biologi*, 5(4), 1–7.
- Noer, S. (2021). Identifikasi Bakteri secara Molekular Menggunakan 16S rRNA. *EduBiologia: Biological Science and Education Journal*, 1(1), 1. <https://doi.org/10.30998/edubiologia.v1i1.8596>
- Nugraha, F., Roslim, D. I., Ardilla, Y. P., & Herman. (2014). Analisis Sebagian Sekuen Gen pada Padi (*Oryza sativa* L.) Indragiri Hilir, Riau. *Biosaintifika*, 6(2), 70–79. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v6i2.3102>
- Pangemanan, E. F. S., Tasirin, J. S., & Saroinsong, F. B. (2019). Keragaman Genetik Pakoba: Studi Pendahuluan Keanekaragaman Pakoba. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 5(2), 286–293. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m050225>
- Perkasa, G. S. B., Nainggolan, A., & Dhewantara, Y. L. (2019). Uji Sensitivitas Antibiotik Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Edwardsiella tarda* Skala Laboratorium (In Vitro). *Jurnal Ilmiah Satya Minabahari*, 5(1), 10–17. <https://doi.org/10.53676/jism.v5i1.73>
- Petti, C. A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases*, 44(8), 1108–1114. <https://doi.org/10.1086/512818>
- Rangian, L., Like Ginting, E., Wullur, S., Kaligis, E., Tilaar, S., Tumbol, R., Studi Ilmu Kelautan, P., & Perikanan dan Ilmu Kelautan, F. (2018). Amplifikasi Isolat Bakteri *Sf1 Symbion Spons Facaplysynopsis sp.* dari Perairan Tongkeina, Sulawesi Utara. *Jurnal Ilmiah Platax*, 6(2), 77–82.
- Riadi, S., Situmeang, S. M. F., & Musthari, M. (2017). Isolasi dan Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat (Bal) Dari Yoghurt Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. *Jurnal Biosains*, 3(3), 144–152. <https://doi.org/10.24114/jbio.v3i3.8302>
- Rosari, R. (2014). Karakteristik Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Indigenous Susu sapi Segar Sebagai Kandidat Bakteri Prebiotik dalam Saluran Pencernaan in vitro. *Skripsi*.
- Sophian, A. (2021). Short Communication: Analysis of purity and concentration of extracted DNA on salted fish processed food products. *Asian Journal of Natural Product Biochemistry*, 19(1). <https://doi.org/10.13057/biofar/f190104>
- Srifani, A., Mirnawati, M., Marlida, Y., Rizal, Y., Nurmianti, N., & Lee, K. W. (2024). Identification of novel probiotic lactic acid bacteria from soymilk waste using the 16s rRNA gene for potential use in poultry. *Veterinary World*, 17(5), 1001–1011. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2024.1001-1011>
- Wahjuningrum, D., Ashry, N., & Nuryati, D. S. (2008). Pemanfaatan Ekstrak Daun Ketapang *Terminalia cattapa* untuk Pencegahan dan Pengobatan Ikan Patin *Pangasionodon hypophthalmus* yang Terinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 7(1), 79–94.
- Wei, C., Liu, J., Zhang, C., Liu, J. Y., & Lu, Y. M. (2024). Clinical outcomes of SMILE and WFG-LASIK used to treat myopia and astigmatism: A systematic review and meta-analysis. *Journal Francais d'Ophthalmologie*, 47(4), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2024.104085>
- Widayanti, R., Kusumaastuti, K. A., Novi, J. M., Adani, F. K., Gultom, C. P., Prastiti AD, Nugroho HA, Pakpahan, S. (2021). Genetic variation and phylogenetic analysis of Indonesian indigenous catfish (baung fish) based on mitochondrial 12S rRNA gene. *Veterinary World*, 14(3), 751–757.
- Widyasari, D. Eko Sugeng Pribadi, D. E., Pasribu, F. H. Septiningtyas, W., Adiputra, J. (2020). Melacak Kekerabatan *Brucella sp.* Menggunakan Teknik Reaksi Rantai Polimerase dengan Primer Pendek. *Jurnal Veteriner*, 21(36), 493–502. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2020.21.4.493>
- Yuanawati, D., Farizky, H. S., Santanumurti, M. B., Jamal, M. T., Sani, L. M. I., Madduppa, H., & Sari, P. D. W. (2022). The newest COI molecular detection of Asian redbtail catfish *Hemibagrus nemurus* (Valenciennes, 1840) in Progo River, Magelang, Central Java, Indonesia. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 9(4), 591–600. <https://doi.org/10.5455/JAVAR.2022.1628>
- Yuhana, M., Normalina, I., & Sukenda. (2008). Pemanfaatan ekstrak bawang putih *Allium sativum* untuk pencegahan dan pengobatan pada ikan patin *Pangasionodon hypophthalmus* yang diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 7(1), 95–107.
- Yulintine, Harris, E., Jusadi, D., Affandi, R., & Alimuddin. (2012). Perkembangan Aktivitas Enzim Pada Saluran Pencernaan Larva Ikan Betok (*Anabas testudineus bloch*). *Bionatura-Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik*, 14(1), 59–67.