

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
INTISARI	xvii
<i>ABSTRACT</i>	xix
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Permasalahan	11
1.3. Keaslian Penelitian	12
1.4. Tujuan Penelitian	15
1.5. Manfaat Penelitian	16
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Probiotik dan Paraprobiotik pada Budidaya Udang	17
2.2. Udang Penaeid sebagai Sumber Bakteri Probiotik	20
2.2.1. Keragaman Udang Penaeid dan Habitatnya	20
2.2.2. Keragaman Mikroorganisme dalam Intestinum Udang	22
2.3. Mekanisme Kerja Probiotik dan Paraprobiotik pada Penyehatan Udang	25
2.4. Indikator Kesehatan Udang	29
2.4.1. Performa Pertumbuhan	29
2.4.2. Performa Sistem Imun	30
2.5. Bakteri Asam Laktat (BAL) sebagai Probiotik untuk Budidaya Udang	35
2.5.1. Keragaman BAL	35
2.5.2. Karakteristik Fungsional BAL sebagai Probiotik	37
2.5.3. Senyawa Antimikrobia yang Dihasilkan oleh BAL	38
2.5.3.1. Bakteriosin	38
2.5.3.2. Asam Organik	43
2.5.3.2.1. Asam Laktat	43
2.5.3.2.2. Asam Asetat	45
2.6. Seleksi Probiotik	46
2.7. Bentuk dan Cara Aplikasi Probiotik	46
2.8. Optimasi Produksi Probiotik	47
2.8.1. Pengaruh Sumber Karbon terhadap Pertumbuhan Sel	48
2.8.2. Pengaruh Sumber Nitrogen terhadap Pertumbuhan Sel	48
2.8.3. Pengaruh Temperatur terhadap Pertumbuhan Sel	49
2.8.4. Pengaruh pH terhadap Pertumbuhan Sel	49

	Halaman
2.9. Identifikasi Probiotik BAL	50
2.9.1. Identifikasi Berdasarkan Karakter Biokimia	50
2.9.2. Identifikasi Bakteri Berdasarkan Gen 16S rRNA	51
 BAB III. LANDASAN TEORI DAN HIPOTESIS	
3.1. Landasan Teori	53
3.2. Hipotesis	57
 BAB IV. METODE PENELITIAN	
4.1 Isolasi dan Seleksi Probiotik Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Intestinum Udang Penaeid	58
4.1.1. Alat dan Bahan	59
4.1.2. Pengambilan Sampel Udang	60
4.1.3. Identifikasi Udang	61
4.1.4. Preparasi Sampel Udang	61
4.1.5. Isolasi dan Seleksi BAL Penghasil Bakteriosin	62
4.1.5.1. Pengambilan Sampel Intestinum	62
4.1.5.2. Perlakuan Pra Isolasi	63
4.1.5.2.1. Isolasi dan Seleksi BAL Penghasil Bakteriosin Metode <i>Paper Diffusion Method</i>	63
4.1.5.2.2. Isolasi dan Seleksi BAL Penghasil Bakteriosin Metode <i>Colony Overlay Assay</i>	65
4.1.5.3. Penentuan Aktivitas Bakteriosin secara Semikuantitatif	67
4.1.5.4. Seleksi Isolat BAL Berdasarkan Kemampuan Menghambat Pertumbuhan Bakteri <i>Vibrio</i>	68
4.1.5.4.1. Uji Aktivitas Antibakteri Isolat BAL terhadap <i>Vibrio</i>	68
4.1.5.4.2. Uji Aktivitas Bakteriosin terhadap <i>Vibrio</i>	69
4.1.6. Uji Antagonis antar Isolat BAL Bakteriosinogenik yang Aktif terhadap Bakteri <i>ibrio</i>	70
4.1.7. Penetapan 3 Isolat BAL Terpilih	70
4.1.8. Uji Keamanan Isolat BAL Terpilih terhadap Udang dan Karakterisasi Fungsional Probiotik	70
4.1.8.1. Uji Keamanan Isolat BAL terhadap Udang	70
4.1.8.2. Produksi Enzim Ekstraseluler	71
4.1.8.3. Resistensi terhadap pH Rendah	72
4.1.8.4. Resistensi Terhadap Garam Empedu	73
4.1.8.5. Kemampuan Perlekatan (Adhesi) pada Permukaan	73
4.2. Kajian Optimasi dan Kinetika Pertumbuhan, Produksi Bakteriosin dan Asam Laktat	74
4.2.1. Alat dan Bahan	74
4.2.2. Preparasi Inokulum	74

Halaman

4.2.3. Prosedur Pengukuran Pertumbuhan, Bakteriosin dan Asam Laktat	75
4.2.3.1. Prosedur Pengukuran Pertumbuhan	75
4.2.3.2. Prosedur Pengukuran Produksi Bakteriosin	75
4.2.4. Seleksi Nutrien	75
4.2.5. Pengaruh Faktor Lingkungan terhadap Pertumbuhan dan Produksi Bakteriosin	76
4.2.5.1. Pengaruh Suhu terhadap Pertumbuhan dan Produksi Bakteriosin	76
4.2.5.2. Pengaruh pH terhadap Pertumbuhan dan Produksi Bakteriosin	76
4.2.5.3. Pengaruh Salinitas terhadap Pertumbuhan dan Produksi Bakteriosin	77
4.2.5.4. Pengaruh Agitasi terhadap Pertumbuhan dan Produksi Bakteriosin	77
4.2.6. Eksperimen Seleksi Nutrien Pertumbuhan	77
4.2.7. Pengaruh Konsentrasi Sumber Karbon terhadap Pertumbuhan dan Produksi Bakteriosin	78
4.2.8. Pengaruh Konsentrasi Sumber Nitrogen terhadap Pertumbuhan dan Produksi Bakteriosin	78
4.2.9. Optimasi Produksi Biomassa, Bakteriosin dan Asam Laktat Isolat BAL Terpilih	79
4.3. Kajian Aplikasi Isolat BAL Terpilih untuk Penyehatan Udang	79
4.3.1. Alat dan Bahan	79
4.3.2. Produksi Probiotik Isolat BAL Terpilih	80
4.3.3. Suplementasi Isolat BAL Terpilih ke dalam Pakan Udang	80
4.3.4. Penyiapan Bak Pemeliharaan Udang	81
4.3.5. Aklimasi Udang	81
4.3.6. Perlakuan	82
4.3.7. Pengukuran Parameter Kesehatan Udang	82
4.3.7.1. Performa Pertumbuhan	82
4.3.7.1.1. Sintasan Udang	82
4.3.7.1.2. Pertumbuhan	83
4.3.7.2. Performa Sistem Imun Udang	83
4.3.7.2.1. Pengambilan Hemolimfe	84
4.3.7.2.2. Penghitungan Jumlah Total Hemosit	84
4.3.7.2.3. Penentuan Aktivitas Fagositosis	84
4.3.7.2.4. Penentuan Jumlah Total Protein Plasma	85
4.3.7.2.5. Penentuan indeks kesehatan udang	85
4.3.7.3. Regulasi Gen Imun : Gen LPBP dan Gen <i>Toll-Like Receptor</i>	87
4.3.7.3.1. Ekstraksi RNA	87
4.3.7.3.2. qRT-PCR	87

4.4. Identifikasi Isolat Bakteri Terpilih	89
4.4.3. Identifikasi BAL menggunakan API CH 50	89
4.4.4. Identifikasi berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA	89
4.4.4.1. Ekstraksi DNA	89
4.4.4.2. Amplifikasi Gen 16S rRNA	90
4.4.4.3. Sekuensing Gen 16S rRNA .	90
4.5. Analisis Data	90
 <b>BAB V. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN</b>	
5.1. Isolasi dan seleksi Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Bakteriosin dari Intestinum Udang Penaeid menggunakan Metode <i>Paper Diffusion Method</i>	94
5.2. Isolasi dan Seleksi BAL Penghasil Bakteriosin menggunakan Metode <i>Colony Overlay Assay</i>	96
5.2.1. Seleksi isolat BAL Penghasil Bakteriosin berdasarkan Aktivitas Antibakteri terhadap <i>Vibrio</i>	102
5.2.2. Seleksi berdasarkan Karakter Non-Antagonis antar Isolat Hasil Seleksi	104
5.2.2.1. Uji patogenitas terhadap udang	106
5.2.2.2. Kemampuan Perlekatan pada Bidang Permukaan	107
5.2.2.3. Toleransi terhadap pH Rendah	108
5.2.2.4. Toleransi terhadap Garam Empedu	110
5.2.2.5. Produksi Enzim Ekstra Seluler	112
5.3. Produksi Sel, Bakteriosin dan Asam Laktat Isolat U-181, P-32 dan W-331	113
5.3.1. Pengaruh Sumber Karbon terhadap Pertumbuhan dan Produksi Bakteriosin	113
5.3.2. Pengaruh Sumber Nitrogen terhadap Pertumbuhan dan Produksi Bakteriosin	117
5.3.3. Pengaruh Konsentrasi Sumber Karbon terhadap Pertumbuhan dan Produksi Bakteriosin	122
5.3.4. Pengaruh Konsentrasi Sumber Nitrogen terhadap Pertumbuhan dan Produksi Bakteriosin	126
5.3.5. Pengaruh pH, Suhu, Salinitas dan Agitasi terhadap Pertumbuhan dan Produksi Bakteriosin	129
5.3.6. Optimasi Produksi Sel, Bakteriosin dan Asam Laktat	144
5.4. Uji aplikasi Probiotik Bakteri Asam Laktat (BAL) untuk Penyehatan Udang	149
5.4.1. Pengaruh Aplikasi Probiotik BAL terhadap Sintasan Udang	150
5.4.2. Pengaruh Aplikasi Probiotik BAL terhadap Pertumbuhan Udang	151
5.4.3. Pengaruh Aplikasi Probiotik terhadap Jumlah Total Hemosit (THC) dan Aktivitas Fagositosis Hemosit Udang Vaname	153
5.4.4. Pengaruh Aplikasi Probiotik terhadap Total Protein Plasma	156

	Halaman
5.4.5. Pengaruh Aplikasi Probiotik terhadap Ekspresi Gen LGBP dan <i>Toll-Like</i>	156
5.4.6. Ekspresi Gen LGBP dan <i>Toll-Like</i> Pasca Uji Tantang	159
5.4.7. Indeks Kesehatan Udang	161
5.4.8. Identifikasi Isolat BAL terpilih	162
 BAB VI. PEMBAHASAN UMUM	 168
 BAB VII KESIMPULAN DAN REKOMENDASI	 189
7.1. Kesimpulan	192
7.2. Rekomendasi	
DAFTAR PUSTAKA	193
LAMPIRAN	232

## DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
2.1.	Klasifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL)	36
4.1.	Perlakuan uji aplikasi probiotik	82
4.2.	Primer yang digunakan untuk analisis ekspresi gen	88
5.1.	Hasil isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari udang penaeid hasil tangkapan alam	95
5.2.	Hasil seleksi isolat Bakteri Asam Laktat (BAL)	98
5.3.	Produksi bakteriosin isolat Bakteri Asam Laktat (BAL)	101
5.4.	Aktivitas langsung isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) penghasil bakteriosin yang diisolasi dari intestinum udang penaeid terhadap <i>Vibrio</i>	103
5.5.	Uji antagonis isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) bakteriosinogenik	105
5.6.	Enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh 3 isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) terpilih	112
5.7.	Kinetika kultivasi isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) pada kondisi optimum	149
5.8.	Indeks kesehatan udang <i>Vanamei</i> setelah aplikasi probiotik dan paraprobiotik	162
5.9.	Interpretasi Isolat BAL U-181, P-32 dan W-331 <i>dengan</i> <i>software apiweb<sup>TM</sup> data base V5,1.</i>	163

## DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Skematik klaster gen bakteriosin	42
4.1	Diagram alir penelitian	93
5.1	Hasil isolasi BAL dari intestinum udang penaeid.	95
5.2	Koloni-koloni Bakteri Asam Laktat (BAL) penghasil bakteriosin pada seleksi menggunakan teknik <i>overlay</i> dengan bakteri indikator LB-42	97
5.3	Sintasan post larva udang vanamei (PL20) pada uji tantang probiotik dan paraprobiotik selama waktu uji 96 jam	107
5.4	Kemampuan adhesi isolat BAL	108
5.5	Toleransi isolat BAL pada nilai pH 3	109
5.6	Toleransi isolat U-181 terhadap garam empedu ( <i>bile salt</i> )	111
5.7	Toleransi isolat P-32 terhadap garam empedu ( <i>bile salt</i> )	111
5.8	Toleransi isolat W-331 terhadap garam empedu ( <i>bile salt</i> )	112
5.9	Produksi sel BAL isolat U-181 selama waktu inkubasi 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai sumber karbon	113
5.10	Produksi sel BAL isolat P-32 selama waktu inkubasi 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai sumber karbon	114
5.11	Produksi sel BAL isolat W-331 selama waktu inkubasi 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai sumber karbon	114
5.12	Produksi bakteriosin BAL isolat U-181 selama waktu inkubasi 24 jam dalam medium MRS dengan berbagai sumber karbon.	116
5.13	Produksi bakteriosin BAL isolat P-32 selama waktu inkubasi 24 jam dalam medium MRS dengan berbagai sumber karbon	117
5.14	Produksi bakteriosin BAL isolat W-331 selama waktu inkubasi 24 jam dalam medium MRS dengan berbagai sumber karbon	117
5.15	Produksi sel BAL isolat U-181 selama 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai sumber nitrogen	118
5.16	Produksi sel BAL isolat P-32 selama 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai sumber nitrogen	119
5.17	Produksi sel BAL isolat W-331 selama 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai sumber nitrogen	119
5.18	Produksi bakteriosin BAL isolat U-181 selama 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai sumber nitrogen	120
5.19	Produksi bakteriosin BAL isolat P-32 selama 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai sumber nitrogen	121

Gambar		Halaman
5.20	Produksi bakteriosin BAL isolat W-331 selama 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai sumber nitrogen	121
5.21	Produksi sel BAL isolat U-181 selama 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai konsentrasi glukosa	122
5.22	Produksi sel BAL isolat P-32 selama 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai konsentrasi glukosa	123
5.23	Produksi sel BAL isolat W-331 selama 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai konsentrasi glukosa	123
5.24	Produksi bakteriosin BAL isolat U-181 selama 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai konsentrasi glukosa	124
5.25	Produksi bakteriosin BAL isolat P-32, selama 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai konsentrasi glukosa	125
5.26	Produksi bakteriosin BAL isolat W-331, selama 24 jam dalam medium MRS menggunakan berbagai konsentrasi glukosa	125
5.27	Produksi sel BAL isolat U-181 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai konsentrasi ekstrak khamir	126
5.28	Produksi sel BAL isolat P-32 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai konsentrasi ekstrak khamir.	127
5.29	Produksi sel BAL isolat W-331 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai konsentrasi ekstrak khamir	127
5.30	Produksi bakteriosin BAL isolat U-118 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai konsentrasi ekstrak khamir	128
5.31	Produksi bakteriosin BAL isolat P-32 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai konsentrasi ekstrak khamir	128
5.32	Produksi bakteriosin BAL isolat W-331 (C) selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai konsentrasi ekstrak khamir	129
5.33	Produksi sel BAL isolat U-181 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai pH	130
5.34	Produksi sel BAL isolat P-32 selama waktu inkubasi 24 jam dalam medium MRS pada berbagai pH	130
5.35	Produksi sel BAL isolat W-331 selama waktu inkubasi 24 jam dalam medium MRS pada berbagai pH.	131
5.36	Produksi bakteriosin BAL isolat U-181 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai nilai pH	132
5.37	Produksi bakteriosin BAL isolat P-32 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai nilai pH	132
5.38	Produksi bakteriosin BAL isolat W-331 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai nilai pH.	133



Gambar		Halaman
5.39	Produksi sel BAL isolat U-181 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai suhu	134
5.40	Produksi sel BAL isolat P-32 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai suhu	134
5.41	Produksi sel BAL isolat W-331 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai suhu	135
5.42	Produksi bakteriosin BAL isolat U-181 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai suhu	136
5.43	Produksi bakteriosin BAL isolat P-32 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai suhu	136
5.44	Produksi bakteriosin BAL isolat W-331 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai suhu	137
5.45	Produksi sel BAL isolat U-181 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai konsentrasi NaCl	138
5.46	Produksi sel BAL isolat P-32 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai konsentrasi NaCl	138
5.47	Produksi sel BAL isolat W-331 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai konsentrasi NaCl	139
5.48	Produksi bakteriosin BAL isolat U-181 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai konsentrasi NaCl	139
5.49	Produksi bakteriosin BAL isolat P-32 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai konsentrasi NaCl	140
5.50	Produksi bakteriosin BAL isolat U-331 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai konsentrasi NaCl	140
5.51	Produksi sel BAL isolat U-181 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai kecepatan agitasi	141
5.52	Produksi sel BAL isolat P32 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai kecepatan agitasi	141
5.53	Produksi sel BAL isolat W-331 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai kecepatan agitasi	142
5.54	Produksi bakteriosin BAL isolat U-181 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai kecepatan agitasi	143
5.55	Produksi bakteriosin BAL isolat U-181 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai kecepatan agitasi	143
5.56	Produksi bakteriosin BAL isolat W-331 selama 24 jam dalam medium MRS pada berbagai kecepatan agitasi	144
5.57	Pertumbuhan, produksi asam laktat dan penggunaan glukosa Isolat U-181 pada kondisi optimum skala fermentor	146
5.58	Pertumbuhan, produksi asam laktat dan penggunaan glukosa isolat P-32 pada kondisi optimum skala fermentor	146
5.59	Pertumbuhan, produksi asam laktat dan penggunaan glukosa isolat W-331 pada kondisi optimum skala fermentor	147
5.60	Pertumbuhan dan produksi bakteriosin Isolat U-181 pada kondisi optimum skala fermentor	147

Gambar		Halaman
5.61	Pertumbuhan dan produksi bakteriosin isolat P-32 pada kondisi optimum skala fermentor	148
5.62	Pertumbuhan dan produksi bakteriosin isolat W-331 pada kondisi optimum skala fermentor	148
5.63	Sintasan udang Vanamei pada perlakuan probiotik dan paraprobiotik BAL	151
5.64	Pertambahan berat udang Vanamei pada perlakuan probiotik dan paraprobiotik	152
5.65	Laju pertumbuhan spesifik udang Vanamei pada perlakuan probiotik dan paraprobiotik	153
5.66	Jumlah total hemosit udang Vanamei pada perlakuan probiotik dan paraprobiotik	154
5.67	Aktivitas fagositosis hemosit udang Vanamei pada perlakuan probiotik dan paraprobiotik	155
5.68	Total protein plasma udang Vanamei pada perlakuan probiotik dan paraprobiotik	156
5.69	Ekspresi relative gen LGBP hemosit udang Vanamei pada perlakuan probiotik dan paraprobiotik	157
5.70	Ekspresi relative gen <i>Toll-like</i> hemosit udang Vanamei pada perlakuan probiotik dan paraprobiotik	158
5.71	Ekspresi relative gen LGBP hemosit udang Vanamei pada perlakuan probiotik dan paraprobiotik setelah uji tantang denagn virus WSS (WSSV) jam ke 48	160
5.72	Ekspresi relative gen <i>Toll-like receptor</i> hemosit udang Vanamei pada perlakuan probiotik dan paraprobiotik setelah uji tantang denagn virus WSS (WSSV) jam ke 48	160
5.73	Pohon filogeni isolat BAL terpilih	167

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Data aktivitas anti vibrio isolate BAL non bakteriosinogenik	232
2	Analisis kinetika pertumbuhan dan produksi	235
3	Data hasil analisis statistik	238
4	Data Identifikasi isolat BAL dengan API CH 50 V5.2	256
5	Data sekuen gen 16S rRNA	260
6	Foto aplikasi probiotik pada udang Vaname (untuk parameter sistem imun)	265
7	Foto aplikasi probiotik pada udang Vaname (untuk parameter pertumbuhan)	266
8	Foto aplikasi probiotik pada udang Vaname (untuk uji tantang dengan infeksi WSSV)	267
9	Foto optimasi produksi bakteriosin	268