

Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Proteolitik dari Saluran Pencernaan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Dibudidayakan di Kabupaten Banyumas

Isolation and Molecular Identification of Proteolytic Bacteria from the Digestive Tract of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Cultivated in Banyumas Regency

Mohammad Nurhafid¹, Hamdan Syakuri^{*3}, Oedjijono Oedjijono², Emyliana Listiowati³, Anandita Ekasanti³, Dewi Nugrayani³ & Hendro Pramono²

¹Program Magister Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Jawa Tengah, Indonesia

²Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Jawa Tengah, Indonesia

³Program Studi Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Jawa Tengah, Indonesia

*Penulis korespondensi, email: hamdan.syakuri@unsoed.ac.id

Tanggal Submisi: 14 Februari 2021; **Tanggal Revisi:** 23 Desember 2021; **Tanggal Penerimaan:** 31 Desember 2021

ABSTRAK Keberadaan bakteri proteolitik pada komoditas akuakultur penting untuk dipelajari, salah satunya terkait dengan praktek budidaya ikan skala kecil di daerah pedesaan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan dan melakukan identifikasi secara molekuler bakteri proteolitik yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Sampel ikan nila diambil dari tiga unit kegiatan akuakultur yang menggunakan pakan berbeda di Kabupaten Banyumas yaitu dari Desa Pandak (dengan probiotik, pakan pellet), Desa Beji (tanpa probiotik, pakan tumbuhan) dan Desa Tambaksogra (dengan probiotik, kombinasi pakan pellet dan tumbuhan). Jumlah bakteri, proporsi bakteri proteolitik, dan indeks aktifitas proteolitik diamati dari usus bagian anterior, *middle*, dan posterior. Sampel isolat bakteri proteolitik dikelompokkan berdasarkan hasil analisis restriksi 16S rDNA menggunakan software PhyEIp. Bakteri dari setiap kelompok diidentifikasi berdasarkan sekuen gen 16S rDNA dengan menggunakan analisis BLAST dan analisis filogenetik. Jumlah bakteri di saluran pencernaan ikan nila dari tiga tempat relatif sama dan cenderung meningkat ke arah posterior. Hasil penelitian menunjukkan ikan nila dari Desa Pandak memiliki proporsi bakteri proteolitik yang lebih tinggi dibandingkan sampel ikan dari Desa Beji dan Tambaksogra. Nilai aktivitas bakteri proteolitik saluran pencernaan ikan nila dari Desa Pandak relatif lebih tinggi dibandingkan dari dua desa lainnya. Bakteri proteolitik dari saluran pencernaan ikan nila dapat dikelompokkan menjadi 15 kelompok berdasarkan polimorfisme hasil digesti fragment gen 16S rDNA. Sampel dari 15 kelompok tersebut memiliki sekuen 16S rDNA yang mirip dengan *Pseudomonas aeruginosa* (4 isolat), *Plesiomonas shigelloides*, *Escherichia coli*, *Aeromonas veronii*, *Klebsiella variicola*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter hormaechei* (2 isolat), *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* dan *Bacillus* sp.

Kata kunci: Aktivitas proteolitik; bakteri; 16S rDNA; *Oreochromis niloticus*; saluran pencernaan

ABSTRACT The existence of proteolytic bacteria in aquaculture commodities is important to be evaluated, one of which is related to the practice of small-scale fish farming in rural areas. This study aimed to determine the presence and molecular identification of proteolytic bacteria isolated from the digestive tract of tilapia (*Oreochromis niloticus*). Tilapia samples were collected from three different aquaculture units that used different feeds in Banyumas Regency, namely from Pandak Village (with probiotic, pelleted feed), Beji Village (without probiotics, plant feed), and Tambaksogra Village (with probiotic, combination pelleted feed, and plants). The number of bacteria, the proportion of proteolytic bacteria, and the index of proteolytic activity were observed from the anterior, middle, and posterior intestinal sections. Samples of proteolytic bacterial isolates were grouped based on results of restriction analysis of the 16S rDNA using PhyEIp software. Bacteria from each group were identified based on the 16S rDNA gene sequence using BLAST analysis and phylogenetic analysis. The number of bacteria in the digestive tract of tilapia from three places was relatively the same and tended to increase posteriorly. The results showed that tilapia from Pandak Village had a higher proportion of proteolytic bacteria than fish samples from Beji and Tambaksogra villages. The value of proteolytic bacteria activity in the digestive tract of tilapia from Pandak Village was relatively higher than that of the other two villages. Proteolytic bacteria from the digestive tract of tilapia could be grouped into 15 groups based on the polymorphism of the digested 16S rDNA gene fragment. Samples from the 15 groups had 16S rDNA sequences that were similar to *Pseudomonas aeruginosa* (4 isolates), *Plesiomonas shigelloides*, *Escherichia coli*, *Aeromonas veronii*, *Klebsiella variicola*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter hormaechei* (2 isolates), *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus* sp.

Keywords: Proteolytic activity; bacteria; 16S rDNA; *Oreochromis niloticus*; digestive tract

PENDAHULUAN

Saluran pencernaan ikan menjadi tempat hidup komunitas mikroorganisme yang secara normal hidup, berkembang, dan berinteraksi dengan ikan sebagai inangnya. Mikroorganisme dapat ditemukan di semua bagian saluran

pencernaan, meliputi rongga mulut, esophagus, lambung, pyloric caeca, usus bagian awal, usus bagian tengah, dan usus bagian akhir (Mukherjee et al., 2020; Talwar et al., 2018). Komunitas mikroorganisme tersebut mempengaruhi berbagai fungsi tubuh ikan, antara lain meliputi perkembangan saluran pencernaan, proses pencernaan, nutrisi, ketahanan

terhadap penyakit, dan daya tahan tubuh (Romero *et al.*, 2014). Sebaliknya, kondisi ikan seperti faktor genetik, jenis kelamin, berat, usia, imunitas, dan pergerakan otot saluran pencernaan juga mempengaruhi komunitas mikroorganisme di saluran pencernaan (Wang *et al.*, 2018). Selain itu, faktor lingkungan seperti kualitas air, pakan, dan penggunaan bahan tertentu seperti prebiotik dan probiotik juga menjadi faktor yang mempengaruhi mikroorganisme saluran pencernaan, inangnya maupun interaksi antara keduanya (Ringø *et al.*, 2016; Standen *et al.*, 2015). Hal ini menjadikan komunitas mikroorganisme di saluran pencernaan ikan dapat bervariasi dan unik antar populasi, antar individu ikan, atau bahkan mengalami fluktuasi harian (Su *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2018).

Bakteri menjadi bagian terbesar dari komunitas mikroorganisme di saluran pencernaan ikan dan paling banyak dipelajari (Talwar *et al.*, 2018). Komunitas bakteri, terutama anggota Phylum Proteobacteria, Firmicutes dan Bacteroidetes, dapat mencapai 90% dari total mikroorganisme di saluran pencernaan ikan (Romero *et al.*, 2014; Talwar *et al.*, 2018). Komunitas bakteri di saluran pencernaan ikan banyak dipelajari kaitannya dengan aspek daya tahan tubuh, pengendalian patogen, dan nutrisi. Salah satu peran komunitas bakteri ini dalam aspek nutrisi adalah membantu ikan dalam proses pencernaan makanan dengan memproduksi berbagai jenis enzim hidrolase ekstraseluler (Ganguly & Prasad, 2012; Ray *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2018). Bakteri proteolitik menjadi bagian komunitas bakteri yang berperan dalam fungsi tersebut, yaitu membantu proses digesti protein dengan memproduksi enzim protease (Ray *et al.*, 2012). Bakteri proteolitik dapat ditemukan pada ikan karnivora, herbivora, maupun omnivora (Li *et al.*, 2014).

Bakteri proteolitik di saluran pencernaan ikan penting untuk dipelajari dalam rangka meningkatkan produksi perikanan budidaya (Diwan *et al.*, 2021). Bakteri proteolitik telah dilaporkan dari berbagai spesies ikan seperti, *Anabas testudineus* (Mondal *et al.*, 2008), *Catla catla* (Bairagi *et al.*, 2002; Mondal *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 2010), *Channa punctatus* (Bairagi *et al.*, 2002; Kar *et al.*, 2008; Banerjee *et al.*, 2017), *Cirrhinus mrigala* (Bairagi *et al.*, 2002; Mondal *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 2010), *Clarias batrachus* (Bairagi *et al.*, 2002), *Clarias gariepinus* (Kurniasih *et al.*, 2014), *Ctenopharyngodon idella* (Bairagi *et al.*, 2002), *Cyprinus carpio* (Bairagi *et al.*, 2002), *Etropolis suratensis* (Das *et al.*, 2014), *Heteropneustes fossilis* (Banerjee *et al.*, 2017), *Hypophthalmichthys molitrix* (Bairagi *et al.*, 2002), *Labeo bata* (Mondal *et al.*, 2008), *Labeo calbasu* (Mondal *et al.*, 2008), *Labeo rohita* (Bairagi *et al.*, 2002; Kar *et al.*, 2008; Mondal *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 2010), *Mystus gulio* (Das *et al.*, 2014), *Oreochromis mossambica* (Bairagi *et al.*, 2002), *Oreochromis niloticus* (Mondal *et al.*, 2008), *Scatophagus argus* (Das *et al.*, 2014), *Siganus guttatus* (Armada & Simora, 2016), dan *Terapon jarbua* (Das *et al.*, 2014). Isolasi dan identifikasi jenis bakteri proteolitik yang ditemukan di saluran pencernaan ikan telah banyak dilakukan baik berdasarkan karakteristik biokimiawi maupun karakteristik molekuler. Hasilnya dapat digunakan sebagai salah satu dasar dalam menentukan potensi suatu bakteri proteolitik sebagai kandidat probiotik. Beberapa spesies bakteri proteolitik di saluran pencernaan ikan teridentifikasi sebagai *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus*, dan *Citrobacter freundii*, *Bacillus circulans*, *Bacillus pumilus*, *Micrococcus* sp., dan *Pseudomonas* sp.

(Ray *et al.*, 2010; Ganguly & Prasad, 2012; Kurniasih *et al.*, 2014; Armada & Simora, 2016). Contoh bakteri proteolitik yang telah dikembangkan sebagai kandidat probiotik adalah anggota genus *Bacillus* (Kar *et al.*, 2008; Ganguly & Prasad, 2012; Kurniasih *et al.*, 2014; Tachibana *et al.*, 2021). Hasil studi tersebut juga dapat digunakan sebagai dasar untuk melakukan modulasi komunitas bakteri proteolitik saluran pencernaan ikan untuk meningkatkan produksi komoditas penting akuakultur (Guo *et al.*, 2020; Xia *et al.*, 2020).

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) adalah salah satu komoditas penting akuakultur air tawar. Produksi ikan nila semakin meningkat dari tahun ke tahun dan pada tahun 2018 menyumbang 8,3% dari total produksi ikan teleost di dunia. Berdasarkan jumlah produksi dunia, ikan nila menempati peringkat tiga setelah grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) dan silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) (FAO, 2020). Di Indonesia, produksi ikan nila menempati peringkat pertama untuk komoditas akuakultur air tawar. Produksi komoditas ini di Kabupaten Banyumas menempati peringkat empat setelah gurami, lele, dan bawal (Badan Pusat Statistik, 2017). Beberapa studi telah mempelajari keberadaan komunitas bakteri proteolitik di saluran pencernaan ikan nila (Mondal *et al.*, 2008; Talukdar *et al.*, 2016). Studi tentang bakteri proteolitik ikan nila masih perlu terus dilakukan, salah satunya dikaitkan dengan praktek budidaya ikan yang umum dilakukan di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan dan melakukan identifikasi secara molekuler bakteri proteolitik yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang dibudidayakan di Kabupaten Banyumas.

BAHAN DAN METODE

Sampel ikan dan pengambilan sampel saluran pencernaan

Sampel ikan nila diambil dari tiga lokasi berbeda di Kabupaten Banyumas, yaitu Desa Pandak, Desa Tambaksogra, dan Desa Beji. Ketiga lokasi pengambilan sampel tersebut dipilih dengan mempertimbangkan adanya perbedaan jenis pakan yang diberikan, jenis kolam, dan pemberian probiotik. Sebanyak tiga ikan dari setiap lokasi dibawa dalam kondisi hidup menggunakan transportasi basah ke laboratorium Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Jenderal Soedirman untuk dilakukan observasi.

Panjang ikan diukur menggunakan mistar dan beratnya diukur menggunakan timbangan digital. Setelah itu ikan dimatikan dengan memotong bagian kepala dengan pisau tajam dan dibedah. Usus ikan diurai menggunakan pinset steril secara aseptis untuk mengetahui bagian anterior, middle, dan posterior. Sampel usus sepanjang 0,5 cm bagian anterior diambilkan dari jarak 1 cm setelah lambung, bagian middle dari tepat bagian tengah, dan bagian anterior dari jarak 1 cm dari anus. Untuk setiap bagian usus yang sama, sampel dari tiga ikan perlokasi dimasukkan tabung 1,5 mL yang telah diketahui beratnya.

Isolasi bakteri dan perhitungan jumlah bakteri

Sampel usus digerus menggunakan mikropastel, ditimbang untuk mengetahui berat sampel, dan kemudian dihomogenkan dengan 1 mL larutan fisiologis steril. Pengenceran sampel mengikuti prosedur Madigan & Martinko (2006) yang dimodifikasi. Setiap sampel diencerkan secara berseri (10^{-1} - 10^{-5}) dengan menggunakan lima tabung reaksi yang berisi 4,5 mL fisiologis steril. Hasil pengenceran sampel

kemudian ditumbuhkan pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA, Merck) dengan metode *pour plate* (Tóth et al., 2013). Sebanyak 0,3 mL larutan sampel dari setiap tabung pengenceran diambil dan dimasukkan ke dalam cawan petri kosong steril. Media TSA (suhu $\pm 40^\circ\text{C}$) kemudian dituangkan pada cawan petri tersebut dan dihomogenkan. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 28°C . Koloni yang tumbuh kemudian dihitung dan datanya digunakan untuk menghitung jumlah total bakteri dengan metode perhitungan total *plate count* (TPC) menggunakan modifikasi rumus yang digunakan oleh Madigan & Martinko (2006):

$$\text{Jumlah total bakteri} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{pengenceran}} \times \frac{1}{\text{volume kultur}} \times \frac{1}{\text{berat sampel}}$$

Skrining dan uji aktivitas proteolitik

Skrining bakteri proteolitik dilakukan dengan menumbuhkan 50% dari total koloni bakteri yang dipilih secara acak dari hasil TPC pada media TSA yang mengandung *skim milk* (2%). Setelah inokulasi, kultur bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C . Bakteri proteolitik diketahui dengan adanya zona bening disekitar koloni. Proporsi bakteri proteolitik dari saluran pencernaan dihitung dengan membagi jumlah isolat bakteri bersifat proteolitik dengan jumlah total isolat bakteri (%). Aktivitas bakteri proteolitik dihitung menggunakan rumus yang sudah umum digunakan (Zainuddin et al., 2018):

$$\text{Rasio AP} = \frac{dt}{d0}$$

Keterangan:

AP = aktivitas proteolitik

dt = diameter total zona hidrolisis/zona bening (cm)

d0 = diameter koloni bakteri (cm)

Pengelompokkan bakteri proteolitik dengan analisis restriksi 16S rDNA

Analisis restriksi 16S rDNA dilakukan pada bakteri proteolitik yang dipilih berdasarkan nilai rasio aktifitas proteolitik dan karakteristik morfologi koloni yang meliputi bentuk, ukuran, warna, tepi dan elevasi. Analisis ini dilakukan untuk mengelompokkan bakteri proteolitik berdasarkan kedekatan taksonomik (Lagacé et al., 2004). Tahapan analisis ini terdiri atas ekstraksi DNA, amplifikasi 16S rDNA, restriksi hasil amplifikasi, elektroforesis hasil restriksi, dan analisis hasil elektroforesis menggunakan software *PyElph* (Pavel & Vasile, 2012).

Ekstraksi DNA bakteri dilakukan menggunakan *Genomic DNA Mini Kit* dengan prosedur mengikuti petunjuk (Geneaid) dengan sedikit modifikasi. Sampel DNA diekstrak dari 1 ml kultur bakteri berusia 24 jam pada media *trypticase soy broth* (TSB, Merck). Pelet bakteri dicuci sebanyak 3 kali menggunakan akuades steril diresuspensi dengan 200 μL GT Buffer dan 20 μL Proteinase K. Sampel diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit dengan menggunakan *waterbath* dan dihomogenkan setiap 5 menit. Sampel diberi larutan GBT Buffer sebanyak 200 μL lalu di-vortex selama 10 detik. Sampel lalu diinkubasi kembali pada suhu 60°C selama 20 menit untuk memastikan sel benar-benar lisis. Selain itu, *Elution Buffer* yang akan digunakan pada tahap elusi DNA juga dipanaskan pada suhu 60°C menggunakan *waterbath*. Tahapan selanjutnya adalah *binding* dan *washing* DNA. Sebanyak 200 μL *ethanol absolut* ditambahkan ke dalam sampel lalu dilakukan *vortexing* dan *spindown* masing-masing selama 10 detik. Sampel kemudian dipindahkan

ke dalam GS *column* yang terpasang pada 2-ml *collection tube* dan disentrifugasi pada 1.500 rpm selama 2 menit. *Collection tube* dibuang dan GS *column* dipindahkan ke 2 mL *collection tube* yang baru. Sebanyak 400 μL W1 Buffer ditambahkan ke dalam GS *column* lalu disentrifugasi pada 1.500 rpm selama 30 detik. Larutan yang tertampung pada *collection tube* dibuang. Sebanyak 600 μL *wash buffer* ditambahkan ke GS *column* lalu disentrifugasi pada 1.500 rpm selama 30 detik. Larutan yang tertampung pada *collection tube* dibuang dan GS *column* disentrifugasi selama 3 menit pada 1.500 rpm untuk mengeringkan matriks *column*.

Tahapan selanjutnya adalah elusi DNA. *Elution buffer* sebanyak 100 μL ditambahkan pada GS-*column* yang terpasang pada 1,5 microtube steril. Sampel didiamkan selama 5 menit untuk memastikan *Elution buffer* sepenuhnya terserap. Selanjutnya sampel disentrifugasi pada 1.500 rpm selama 30 detik dan larutan sampel DNA disimpan pada suhu -20°C hingga proses selanjutnya.

Sampel DNA kemudian digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi 16S rDNA menggunakan *MyTaq HS Red Mix* (Bioline). Amplifikasi rDNA dilakukan dengan mesin Primus 25 Thermocycler PCR (*Peqlab*) menggunakan primer 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') yang hasil sekitar 1500 bp (Marchesi et al., 1998). Volume total reaksi PCR adalah 50 μL yang terdiri atas 1 μL sampel DNA, 1 μL primer 63f, 1 μL primer 1387r, 25 μL *MyTaq HS Red Mix 2x*, dan 22 μL *nuclease free water*. Reaksi PCR diawali dengan tahap *pre-denaturasi* (94°C selama 2 menit); diikuti 35 siklus: *denaturasi* 94°C selama 20 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik dan *extention* pada suhu 72°C selama 20 detik; dan diakhiri tahap *final extention* pada suhu 72°C selama 5 menit serta suhu akhir 25°C . Keberhasilan amplifikasi dievaluasi dengan melakukan elektroforesis menggunakan gel agarose 1,5 % yang mengandung *FloroSafe DNA stain* pada *buffer Tris base Boric acid EDTA* (TBE) dengan 100 bp DNA Ladder (CSL) sebagai standar. Elektroforesis dilakukan selama 50 menit pada 125 mV. Hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan *UV-transilluminator* dan gambar diambil menggunakan kamera digital.

Tahap ketiga yaitu pemotongan hasil PCR menggunakan enzim restriksi *RsaI* (GT↓AC), *HaeIII* (GG↓CC) dan *AluI* (AG↓CT) mengikuti prosedur dari Thermo Scientific. Prosedur dilakukan dengan membuat campuran yang terdiri atas 10 μL hasil PCR, 2 μL 10X *buffer tango*, 8 μL *nuclease free water* dan 1 μL enzim restriksi. Campuran tersebut kemudian diinkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C . Hasil pemotongan kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose 1,5% yang mengandung *FloroSafe DNA stain* pada *buffer TBE* dengan 100 bp DNA Ladder (CSL) sebagai standar. Elektroforesis dilakukan selama 50 menit pada 125 mV. Hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan *UV-transilluminator* dan gambar diambil menggunakan kamera digital.

Tahap terakhir yaitu pengelompokan bakteri hasil restriksi. Pengelompokan bakteri dilakukan dengan menggunakan program *PhyElph1.4* (Pavel & Vasile, 2012). Langkah pertama adalah menampilkan file gambar hasil elektroforesis

pemotongan enzim restriksi (jpeg) pada program tersebut. Langkah berikutnya terdiri atas penentuan lajur, penentuan pita DNA, pengelompokan pita DNA, dan pembuatan pohon filogenetik. Pengelompokan bakteri dianalisis menggunakan metode UPGMA yang tersedia dalam program tersebut.

Identifikasi bakteri berdasarkan sekuen 16S rDNA

Sampel dari setiap kelompok bakteri yang dihasilkan dari analisis restriksi 16S rDNA diidentifikasi secara molekuler berdasarkan sekuen gen 16S rDNA. Identifikasi bakteri dilakukan dengan analisis sekuen DNA menggunakan analisis *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dan analisis filogenetik.

Hasil PCR utuh (1500bp) sampel terpilih dari setiap kelompok dan sepasang primer dikirimkan ke 1st BASE DNA sequencing di Malaysia (Apical Scientific Sdn Bhd) melalui PT. Genetika Science Indonesia. Proses sekuensing dilakukan dengan BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Hasil sekuensing diedit menggunakan program BioEdit untuk menghasilkan *consensus sequence*.

Tahap kedua yaitu Analisis *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) yang dilakukan secara online untuk mencari kemiripan sekuen sampel dengan data sekuen yang terdapat di genbank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>). Tahap terakhir yaitu analisis pohon filogenetik bakteri proteolitik. Konstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan sekuen dari penelitian ini dan sekuen dari Genbank. Sekuen dari Genbank meliputi semua sekuen hasil BLAST dengan homologi tertinggi dengan sekuen sampel, yaitu sekuen dengan *accession number* MK367616.1, MT633047.1, MT318155.1, MT646431.1, MK905514.1, MW025989.1, MG871227.1, MT369949.1, MT163395.1, MN725742.1, KP842829.1, KF863877.1, MT645613.1, MT125869.1, MG937649.1. Analisis filogenetik dilakukan menggunakan program online yaitu phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr>) dengan tahapan meliputi *alignment* menggunakan MUSCLE, *curation* menggunakan Gblocks (Castresana, 2000), *phylogeny* menggunakan PhyML (Gascuel, 1997), dan *rendering* menggunakan Tree Dyn, serta dievaluasi menggunakan *bootstrapp* 1000 kali (Chevenet *et al.*, 2006).

Analisis data

Data jumlah bakteri, proporsi bakteri proteolitik, dan indeks aktivitas proteolitik secara deskriptif dibandingkan antar kelompok sampel dan dikaitkan dengan beberapa faktor

pemeliharaan yang meliputi jenis pakan, jenis kolam, dan penggunaan probiotik. Data terkait 16S rDNA dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Ukuran sampel ikan, jenis pakan, pemberian probiotik, dan jenis kolam

Sampel ikan nila diambil dari tiga lokasi yang berbeda, yaitu Desa Pandak, Desa Beji, dan Desa Tambaksogra Kabupaten Banyumas. Tabel 1 menampilkan ukuran ikan, jenis pakan, pemberian probiotik, dan jenis kolam. Sampel ikan memiliki panjang berkisar 13,2-16,6 cm dan berat berkisar 37,8-92 g. Sampel ikan dari Desa Pandak adalah hasil budidaya dengan pakan berupa pellet komersial dan dari Desa Beji dengan pakan berupa tumbuhan. Ikan yang berasal dari Desa Tambaksogra dibudidayakan dengan pakan kombinasi pakan buatan komersial dan tumbuhan. Selain itu, sampel ikan dari Desa Pandak dan Desa Tambaksogra diberi probiotik. Jenis mikroorganisme dalam probiotik hanya diketahui dari probiotik komersial yang digunakan di Desa Tambaksogra, meliputi *Lactobacillus* sp., *Nitrosomonas* sp., *Bacillus* sp., *Acetobacter* sp., *Streptomyces* sp., dan yeast. Jenis kolam yang digunakan di semua lokasi berdasar tanah dengan dinding semen (Pandak dan Tambaksogra) atau tanah (Beji). Kualitas air tidak dievaluasi pada kolam pemeliharaan tersebut. Berdasarkan informasi dari pembudidaya, ikan tumbuh dengan baik. Hal tersebut menjadi indikasi kondisi kualitas air kolam pemeliharaan mampu mendukung kehidupan ikan.

Jumlah total bakteri saluran pencernaan ikan nila

Jumlah bakteri di saluran pencernaan ikan nila disajikan berdasarkan lokasi sampling dan berdasarkan bagian saluran pencernaan (Tabel 2). Hasil menunjukkan bahwa jumlah bakteri saluran pencernaan ikan nila dari tiga lokasi berbeda berkisar $2,2-7,2 \times 10^5$ CFU/g. Sampel ikan dari Desa Tambaksogra memiliki jumlah bakteri di saluran pencernaan tertinggi ($7,2 \pm 4,4 \times 10^5$ CFU/g), diikuti berturut-turut sampel ikan dari Desa Pandak ($4,5 \pm 1,2 \times 10^5$ CFU/g) dan sampel ikan dari Desa Beji ($2,2 \pm 1,6 \times 10^5$ CFU/g). Secara umum, jumlah bakteri saluran pencernaan ikan nila cenderung meningkat ke arah posterior. Rata-rata jumlah bakteri di bagian anterior usus adalah $2,4 \pm 1,5 \times 10^5$ CFU/g, di bagian *middle* $4,6 \pm 2,1 \times 10^5$ CFU/g, dan di bagian posterior $7,0 \pm 4,5 \times 10^5$ CFU/g.

Tabel 1. Lokasi asal, ukuran ikan, jenis pakan, penggunaan probiotik, dan jenis kolam dari sampel ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

No.	Lokasi (Desa)	Ukuran ikan		Jenis pakan	Probiotik	Jenis kolam
		Panjang total (cm)	Berat (g)			
1	Pandak	13,2	37,8	Pakan buatan komersial	Ya	Dindingsemen, dasartanah
2	Beji	16,6	92	Tumbuhan	Tidak	Dinding dan dasartanah
3	Tambaksogra	14,5	48,8	Kombinasi pakan buatan komersial dan tumbuhan	Ya	Dindingsemen, dasartanah

Tabel 2. Jumlah total bakteri saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

Bagian saluran pencernaan	Jumlah bakteri (CFU/g) berdasarkan lokasi			Rata-rata \pm S.D
	Pandak	Beji	Tambaksogra	
Anterior	$3,1 \times 10^5$	$6,5 \times 10^4$	$3,4 \times 10^5$	$2,4 \pm 1,5 \times 10^5$
Middle	$5,4 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$6,1 \times 10^5$	$4,6 \pm 2,1 \times 10^5$
Posterior	$5,1 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$7,0 \pm 4,5 \times 10^5$
Rata-rata \pm S.D	$4,5 \pm 1,2 \times 10^5$	$2,2 \pm 1,6 \times 10^5$	$7,2 \pm 4,4 \times 10^5$	

Proporsi dan indeks aktifitas bakteri proteolitik dari saluran pencernaan ikan nila

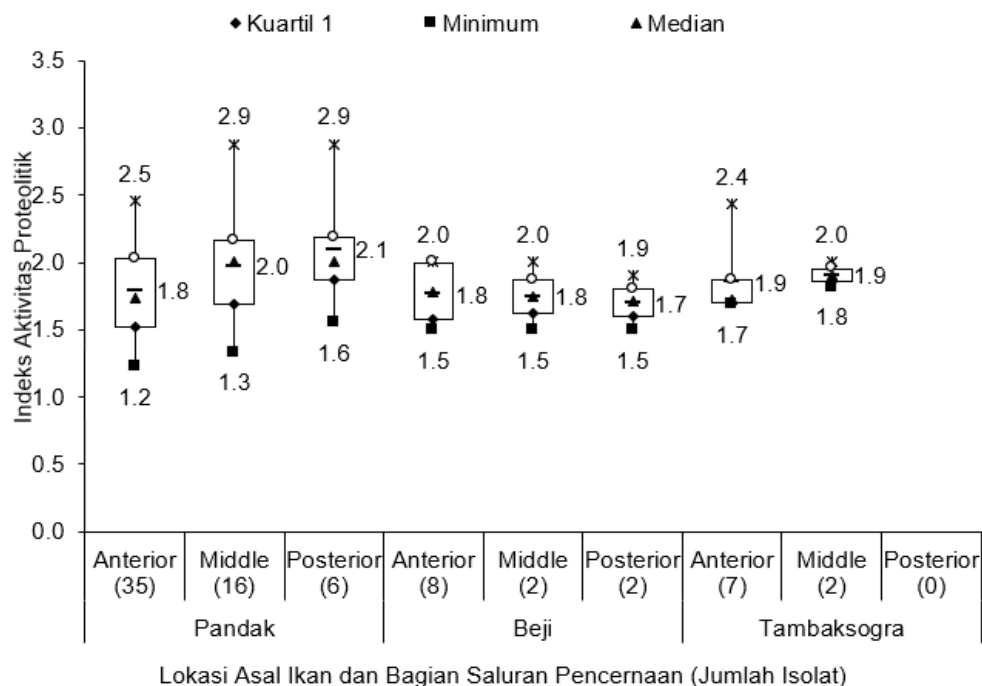
Tabel 3 menunjukkan proporsi bakteri proteolitik di saluran pencernaan ikan nila yang dilengkapi dengan jumlah koloni bakteri proteolitik. Berdasarkan lokasi, sampel ikan dari Desa Pandak memiliki proporsi bakteri proteolitik paling tinggi

(49 %), diikuti sampel ikan dari Desa Beji (33%), dan sampel ikan dari Desa Tambaksogra (18%). Proporsi bakteri proteolitik di sepanjang saluran pencernaan menurun ke arah posterior. Sekitar 70% bakteri di usus bagian anterior bersifat proteolitik. Proporsi bakteri proteolitik di usus bagian lain jauh lebih rendah, yaitu sekitar 21% untuk bagian *middle* dan hanya

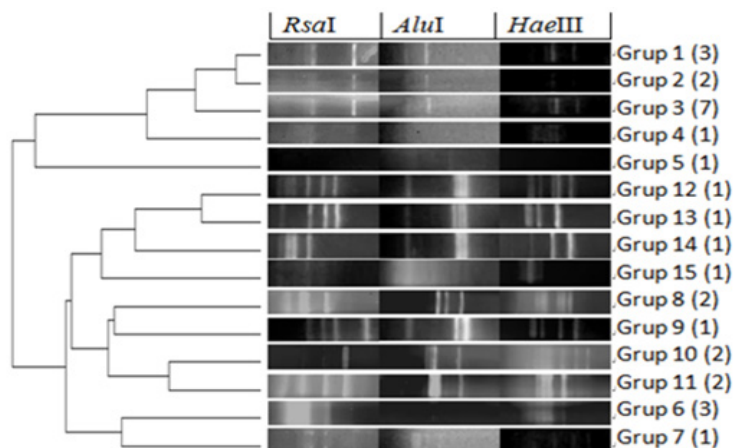
Tabel 3. Jumlah koloni dan proporsi bakteri proteolitik saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) berdasarkan jenis pakan dan bagian saluran pencernaan.

Bagian saluran pencernaan	Pandak			Beji			Tambaksogra			Rata-rata proporsi (%)±S.D
	KP(n)	TK(N)	PKP(%)	KP(n)	TK(N)	PKP(%)	KP(n)	TK(N)	PKP(%)	
Anterior	35	45	78	8	9	89	7	16	44	70±24
Middle	16	34	47	2	34	6	2	21	10	21±23
Posterior	6	26	23	2	44	5	0	11	0	9±12
Rata-rata±S.D	19±15	35±10	49±27	4±3	29±18	33±48	3±4	16±5	18±23	

Keterangan: KP (koloni proteolitik), TK (total koloni), dan PKP (proporsi koloni proteolitik)



Gambar 1. Indeks aktifitas bakteri proteolitik saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) berdasarkan jenis pakan dan bagian saluran pencernaan.



Gambar 2. Dendrogram isolat bakteri proteolitik saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) berdasarkan hasil restriksi 16SrDNA.

Keterangan: angka dalam tanda kurung menunjukkan jumlah isolat dalam kelompok

sekitar 9%. untuk bagian posterior.

Hasil uji aktivitas bakteri proteolitik dari saluran pencernaan ikan nila disajikan pada Gambar 1. Nilai indeks proteolitik bakteri saluran pencernaan ikan nila dari Desa Pandak lebih beragam dibandingkan dari dua desa lain. Indeks proteolitik bakteri proteolitik saluran pencernaan ikan dari Desa Pandak memiliki berkisar 1,2-2,9 dari Desa Beji berkisar 1,5-2,0 dan dari Desa Tambaksogra berkisar 1,7-2,4. Selain itu, rata-rata indeks proteolitik sampel ikan dari Desa Pandak juga cenderung lebih tinggi dibandingkan rata-rata indeks tersebut dari sampel ikan yang berasal dari Desa Beji dan Desa Tambaksogra.

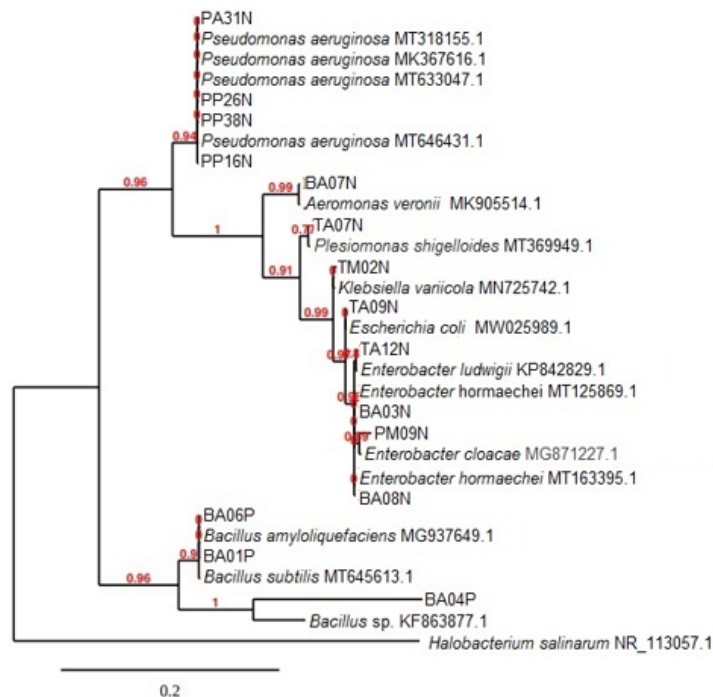
Identifikasi molekuler bakteri proteolitik

Isolat bakteri proteolitik saluran pencernaan ikan nila dari tiga lokasi dapat dikelompokkan menjadi dua puluh sembilan (29) kelompok berdasarkan karakteristik Gram KOH, morfologi koloni, dan nilai indeks proteolitik (data tidak ditunjukkan). Sampel isolat bakteri dari setiap kelompok dipilih secara acak untuk kemudian dikelompokkan lebih lanjut menggunakan analisis restriksi 16S rDNA. Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa 29 kelompok bakteri proteolitik tersebut dapat dikelompokkan lebih lanjut menjadi lima belas (15) kelompok bakteri (Gambar 2).

Hasil amplifikasi 16S rDNA isolat bakteri proteolitik dari 15

Tabel 4. Hasil analisis BLAST sekuen 16S rDNA bakteri proteolitik saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

Kelompok	Kode Isolat	HasilBlast	Similaritas(%)	Accession Number	Phylum
1	PA38N	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain CL-9	99,57	MK367616.1	Proteobacteria
2	PA31N	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain OIS 4.8.1	99,93	MT633047.1	Proteobacteria
3	PP16N	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain CGA1	99,63	MT318155.1	Proteobacteria
4	PP26N	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain MLTBM2	100,00	MT646431.1	Proteobacteria
5	BA07N	<i>Aeromonas veronii</i> strain Liv-1	99,91	MK905514.1	Proteobacteria
6	TA09N	<i>Escherichia coli</i> strain DT003	99,93	MW025989.1	Proteobacteria
7	PM09N	<i>Enterobacter cloacae</i> strain FC1375	99,27	MG871227.1	Proteobacteria
8	TA07N	<i>Plesiomonas shigelloides</i> strain 190719	99,97	MT369949.1	Proteobacteria
9	BA08N	<i>Enterobacter hormaechei</i> sub sp. xiangfangensis strain DST25	100,00	MT163395.1	Proteobacteria
10	TM02N	<i>Klebsiella variicola</i> strain SA002	98,88	MN725742.1	Proteobacteria
11	TA12N	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain MTCC 12260	99,90	KP842829.1	Proteobacteria
12	BA04P	<i>Bacillus</i> sp. strain hb88	85,90	KF863877.1	Firmicutes
13	BA01P	<i>Bacillus subtilis</i> strain HR-4	100,00	MT645613.1	Firmicutes
14	BA03N	<i>Enterobacter hormaechei</i> strain 1847819	99,90	MT125869.1	Proteobacteria
15	BA06P	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain SML_M77	99,66	MG937649.1	Firmicutes



Gambar 3. Pohon filogenetik bakteri proteolitik saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) menggunakan sekuen 16S rDNA dan dianalisis menggunakan Neighbor-joining dengan Bootstrap 1000 kali.

kelompok bakteri berhasil disekuensing. Identifikasi bakteri secara molekuler berdasarkan sekuen gen tersebut berhasil dilakukan menggunakan analisis BLAST dan analisis filogenetik. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa hampir semua sekuen 16S rDNA sampel memiliki homologi atau persen identik yang tinggi (99-100%) dibandingkan dengan sekuen yang relevan di genbank (Tabel 4). Sebagai pengecualian, isolat kode BA04P memiliki sekuen 16S rDNA dengan tingkat homologi hanya 85,9% dengan sekuen gen yang sama dari satu strain *Bacillus* sp. (KF863877.1).

Hasil analisis filogenetik memperkuat hasil identifikasi molekuler bakteri proteolitik dari saluran pencernaan ikan nila menggunakan analisis BLAST. Gambar 3 menunjukkan pohon filogenetik yang dibuat berdasarkan sekuen 16S rDNA memiliki percabangan dengan nilai kepercayaan yang tinggi, ditunjukkan dengan nilai *bootstrap* yang mendekati 1. Berdasarkan hasil analisis BLAST dan analisis filogenetik, sampel dengan kode isolat PA31N, PP26N, PA38 dan PP16N teridentifikasi sebagai spesies *Pseudomonas aeruginosa*. Sampel dengan kode isolat BA01P dan BA06P teridentifikasi sebagai spesies *Bacillus subtilis* dan *Bacillus amyloliquefaciens*. Empat isolat teridentifikasi sebagai anggota Genus *Enterobacter*, yaitu *Enterobacter hormaechei* (BA03N, BA08N), *Enterobacter ludwigii* (TA12N), dan *Enterobacter cloacae* (PM09N). Tiga isolat bakteri termasuk anggota Genus *Bacillus*, yaitu isolate BA06P teridentifikasi sebagai *Bacillus amyloliquefaciens*, isolate BA01P sebagai *Bacillus subtilis*, dan isolate BA04P belum dapat diidentifikasi hingga tingkat spesies. Empat isolat lainnya teridentifikasi sebagai *Aeromonas veronii* (BA07N), *Plesimonas shigelloides* (TA07N), *Klebsiella variicola* (TMO2N), dan *Escherichia coli* (TA09N).

Pembahasan

Isolasi Bakteri saluran pencernaan ikan nila dalam penelitian ini dilakukan dari sampel usus yang tidak dipisahkan antara bahan pakan, bagian lumen, mukus dan jaringan epithelium, sehingga bakteri yang diperoleh terdiri atas kelompok bakteri yang bersifat sementara (*allochthonus*) dan kelompok bakteri yang menetap (*autochthonus*). Kelompok bakteri sementara adalah bakteri yang terbawa masuk pada saat ikan mengkonsumsi makanan, hidup sementara dalam saluran pencernaan dan akan terbawa keluar pada saat ikan mengeluarkan kotoran. Bakteri yang menetap adalah bakteri yang mampu tumbuh dan membentuk koloni di jaringan mukus dan permukaan epithelium saluran pencernaan, sehingga tidak terbawa keluar pada saat ikan mengeluarkan kotoran (Ringø et al., 2016). Selain itu bakteri yang diperoleh dalam penelitian ini sebatas pada bakteri yang dapat ditumbuhkan menggunakan media umum (*trypticase soy agar*, TSA). Hal ini tentu menyebabkan hasil penelitian ini hanya menggambarkan sebagian kecil bakteri proteolitik di saluran pencernaan ikan nila. Bakteri saluran pencernaan ikan dikenal memiliki tingkat kultivasi yang rendah, yaitu kurang dari 0,1% dari total komunitas bakteri di saluran pencernaan (Wanget al., 2018).

Jumlah bakteri saluran pencernaan ikan nila dalam penelitian ini semakin meningkat ke arah posterior. Hasil ini sesuai dengan sebagian besar laporan penelitian sebelumnya dari beberapa spesies ikan lain, sebagaimana dirangkum oleh Ringø et al. (2016); dan Wang et al. (2018). Beberapa faktor yang mempengaruhi distribusi bakteri di sepanjang saluran pencernaan ikan antara lain adalah (Ringø et al., 2016) : 1)

cairan yang dikeluarkan dari liver dan pankreas, 2) derajat keasaman (pH), dan 3) kandungan nutrient pada pakan. Cairan dari liver dan pankreas bersifat asam dan mengandung bahan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Cairan ini masuk ke saluran pencernaan di suatu titik setelah lambung, sehingga efeknya paling tinggi di bagian anterior usus dan semakin menurun ke arah posterior. Jumlah nutrien sebagai sumber energi baik bagi inang maupun bakteri di saluran pencernaannya terdistribusi semakin menurun ke arah posterior. Faktor nutrien kemungkinan menjadi faktor yang menyebabkan adanya pola distribusi bakteri saluran pencernaan yang berbeda. Distribusi bakteri di saluran pencernaan ikan dapat juga terjadi dengan pola menurun ke arah posterior atau merata antar bagian saluran pencernaan (Wanget al., 2018).

Jumlah total bakteri, proporsi bakteri proteolitik, dan indeks proteolitik bakteri saluran pencernaan ikan nila, dalam penelitian ini, bervariasi antar tempat pengambilan sampel. Hal ini tentu dipengaruhi oleh beberapa perbedaan dalam aspek pemeliharaan baik yang tercatat maupun tidak tercatat dalam penelitian ini. Perbedaan aspek pemeliharaan yang diketahui adalah jenis pakan dan penggunaan probiotik. Jumlah bakteri saluran pencernaan ikan nila yang diberi kombinasi pakan komersial dan probiotik (Pandak dan Tambaksogra) lebih tinggi dibandingkan dengan yang diberi pakan berupa tumbuhan (Beji). Ikan yang diberi kombinasi pakan komersial juga memiliki proporsi bakteri proteolitik yang lebih tinggi untuk sampel dari Pandak, tetapi tidak untuk sampel dari Tambaksogra dimana ikan dari lokasi ini memiliki proporsi bakteri proteolitik yang lebih rendah dibandingkan yang diberi pakan berupa tumbuhan. Bakteri proteolitik saluran pencernaan ikan nila yang diberi pakan komersial dan probiotik (Pandak) memiliki indeks proteolitik yang relatif lebih tinggi. Hasil ini mengindikasikan pengaruh baik kombinasi pakan komersial dan probiotik pada jumlah bakteri, proporsi bakteri proteolitik, dan indeks proteolitik bakteri di saluran pencernaan ikan nila. Hasil yang tidak konsisten diperoleh pada sampel dari Tambaksogra. Ikan dari daerah ini selain diberi pakan komersial dan probiotik juga diberi tumbuhan sebagai pakan. Dalam penelitian ini, keterkaitan jenis pakan dan penggunaan probiotik dengan komunitas bakteri di saluran pencernaan ikan nila tidak dapat dianalisis lebih lanjut karena 1) jumlah sampel yang terbatas dan 2) terdapat banyak faktor yang tidak diketahui dalam penelitian ini, misalkan strain ikan dan kualitas air.

Pengaruh jenis pakan dan pemberian probiotik terhadap bakteri saluran pencernaan ikan sudah banyak dilaporkan. Pemberian probiotik telah dilaporkan mempengaruhi komposisi bakteri di saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*), di mana keberadaan bakteri patogen cenderung menurun (Kuebutornye et al., 2020). Namun demikian tidak semua pemberian probiotik mempengaruhi bakteri saluran pencernaan ikan. Sebagai contoh adalah penelitian yang dilakukan oleh Adeoye et al. (2016) yang memberi ikan nila dengan probiotik yang dikombinasikan dengan enzim. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemberian probiotik tidak mempengaruhi bakteri di saluran pencernaan ikan nila. Bakteri saluran pencernaan ikan dipengaruhi oleh banyak faktor yang dapat dikelompokkan menjadi faktor ikan, faktor lingkungan, dan faktor mikroorganisme dan dapat bervariasi antar individu dan dapat berfluktuasi dari hari ke hari (Wang et al., 2018). Pakan dan kondisi air adalah bagian dari faktor lingkungan

yang dalam penelitian ini tidak sama antar lokasi pengambilan sampel.

Proporsi bakteri proteolitik di saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dalam penelitian ini menurun ke arah posterior dan rata-rata indeks aktifitasnya relatif meningkat ke arah posterior. Proporsi bakteri proteolitik dalam penelitian ini tidak sesuai dengan beberapa hasil penelitian sebelumnya, yang kemungkinan disebabkan oleh perbedaan kondisi lingkungan dan kondisi pemeliharaan ikan. Kajian yang dilaporkan oleh [Ray et al. \(2012\)](#) menyimpulkan bahwa kepadatan populasi bakteri penghasil protease paling banyak terdapat pada usus ikan bagian posterior. Pola distribusi bakteri proteolitik di saluran pencernaan ikan nila dilaporkan mirip dengan yang ada pada saluran pencernaan *Labeo rohita*, *Catla catla*, *Cirrhinus mrigala*, *Labeo bata*, *Labeo calbasu*, dan *Anabas testudineus*, yaitu jumlah bakteri proteolitik di usus bagian posterior lebih tinggi dibandingkan di usus bagian anterior ([Mondal et al., 2008](#)). Nilai indeks aktifitas bakteri proteolitik dari saluran pencernaan ikan nila dalam penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya pada spesies ikan yang sama, yaitu meningkat ke arah posterior ([Mondal et al., 2008](#)).

Hasil penelitian ini menunjukkan bakteri proteolitik dalam saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) teridentifikasi sebagai anggota dari dua phylum, yaitu Proteobacteria dan Firmicutes. Dua phylum ini telah banyak dilaporkan mendominasi populasi bakteri di saluran pencernaan ikan, selain Fusobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, dan Verrucomicrobia ([Wang et al., 2018](#)). [Mukherjee et al. \(2020\)](#) melaporkan bahwa Proteobacteria dan Firmicutes menjadi dua phylum bakteri yang paling mendominasi populasi bakteri di saluran pencernaan tiga spesies ikan yang diamati, *Labeo rohita*, *Catla catla*, dan *Cirrhinus mrigala*. Hasil penelitian ini juga sesuai dengan hasil penelitian [Bereded et al. \(2020\)](#) yang menunjukkan bahwa bakteri yang berada di dalam saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang berasal dari dua danau di Ethiopia sebagian besar termasuk phylum Firmicutes dan Proteobacteria.

Sebagian spesies bakteri proteolitik yang teridentifikasi dalam penelitian ini diduga termasuk bakteri yang dapat hidup menetap dalam saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Dalam penelitian ini, bakteri proteolitik yang ditemukan pada saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) antara lain adalah *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas veronii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, dan satu isolat *Bacillus* sp. [Askarian et al. \(2012\)](#) melaporkan bahwa genus bakteri *Pseudomonas*, *Aeromonas*, dan *Bacillus* termasuk bakteri yang mampu hidup menetap di saluran pencernaan salmon Atlantik (*Salmo salar* L.). Penelitian tersebut dilakukan dengan membersihkan sampel usus dari material lumen untuk menghilangkan bakteri yang tinggal sementara di saluran pencernaan ([Askarian et al., 2012](#)).

Bakteri proteolitik yang ditemukan di saluran pencernaan ikan nila dalam penelitian ini sebagian dapat dijadikan bakteri kandidat probiotik, yaitu yang teridentifikasi sebagai anggota Phylum Firmicutes. Bakteri Firmicutes yang ditemukan dalam penelitian ini adalah *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, dan satu isolate *Bacillus* yang tidak dapat diidentifikasi lebih spesifik. *Bacillus* adalah salah satu genus dalam Phylum Firmicutes yang banyak digunakan sebagai

probiotik komersial dan juga banyak digunakan untuk memproduksi enzim ([Ray et al., 2012](#)). Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diberi *Bacillus subtilis* dan *Bacillus licheniformis* dilaporkan memiliki pertumbuhan dan memiliki komposisi bakteri saluran pencernaan yang lebih baik, dan memiliki kelompok bakteri patogen yang lebih rendah ([Tachibana et al., 2021](#)).

Penelitian ini menemukan keberadaan bakteri proteolitik yang dapat bersifat patogen bagi manusia, yaitu *Escherichia coli* dan *Klebsiella variicola*. *E. coli* yang ada di perairan umum dapat menyebabkan gangguan pada saluran pencernaan manusia dan hewan terrestrial. Keberadaan *E. coli* di dalam saluran pencernaan ikan dapat mengindikasikan terjadi kontaminasi perairan dengan limbah dari rumah tangga, hal ini masih banyak terjadi di daerah pedesaan. Keberadaan *E. coli* di dalam saluran pencernaan ikan juga dapat dikaitkan dengan penggunaan pupuk yang berasal dari kotoran hewan ternak ([Dang & Dalsgaard, 2012](#)). Bakteri ini juga dilaporkan berada dalam saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang dipelihara secara semi intensive di Brazil ([Molinari et al., 2003](#)). Bakteri ini tidak pernah dilaporkan menyebabkan penyakit pada ikan, sehingga keberadaannya di saluran pencernaan kemungkinan bersifat sementara dan dapat membantu kinerja pencernaan ikan, salah satunya dengan aktifitas proteolitik yang dimilikinya. Namun demikian, keberadaan *E. coli* di dalam saluran pencernaan ikan harus dikendalikan karena berpengaruh negatif terhadap kesehatan manusia. Keberadaan *Klebsiella variicola* juga dilaporkan di saluran pencernaan silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) sebagai bakteri penghasil tannase ([Talukdar et al., 2016](#)). Bakteri ini tidak dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik meskipun mampu memproduksi tannase, yang dapat digunakan untuk menurunkan kandungan tannin (antinutrient) pada bahan pakan. Hal ini karena bakteri ini dapat menyebabkan masalah kesehatan bagi manusia ([Maatallah et al., 2014](#)).

Hasil penelitian ini mengindikasikan dominasi *Pseudomonas aeruginosa* di saluran pencernaan ikan nila. Empat (4) dari lima belas (15) sampel isolat bakteri proteolitik dalam penelitian ini berdasarkan sekuen gen 16S rDNA teridentifikasi sebagai *Pseudomonas aeruginosa*. Selain itu, satu isolat *Aeromonas* juga teridentifikasi di saluran pencernaan ikan nila, yaitu *Aeromonas veroni*. Hasil ini sesuai dengan ciri khas komunitas bakteri di saluran pencernaan ikan air tawar yang didominasi *Aeromonas*, *Pseudomonas*, dan *Bacteroides* tipe A ([Wang et al., 2018](#)). *Pseudomonas aeruginosa* dalam budidaya perikanan memiliki peran-peran yang saling bertolak belakang. Di satu sisi bakteri ini dapat digunakan untuk meningkatkan daya tahan tubuh ikan, namun di sisi lain bakteri ini juga dilaporkan menyebabkan penyakit pada ikan. Pemberian *Pseudomonas aeruginosa* dalam kondisi hidup pada pakan satu spesies ikan air tawar (*Labeo rohita*) dapat meningkatkan parameter daya tahan tubuh seperti kandungan lisosim pada serum, dan fagositosis, serta meningkatkan sintasan saat diinfeksi dengan *Aeromonas hydrophila* ([Giri et al., 2012](#)). Satu jenis ikan (*Labeo rohita*) yang diberi pakan mengandung heat-killed *Pseudomonas aeruginosa* dilaporkan menunjukkan peningkatan parameter daya tahan tubuh non spesifik dan sintasan yang lebih tinggi ketika diinfeksi dengan *Aeromonas hydrophila* ([Giri et al., 2020](#)). Namun demikian, terdapat strain *Pseudomonas aeruginosa* dapat menyebabkan penyakit pada ikan ([Baldissera](#)

et al., 2019; Ali et al., 2021). Infeksi *Pseudomonas aeruginosa* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) menimbulkan gejala seperti bintik kemerahan, sirip geripis, nekrosis pada insang, hati berwarna pucat, *serous fluid exudate*, dan *congested kidney* (Algammal et al., 2020). Untuk itu, penggunaan *Pseudomonas aeruginosa* untuk meningkatkan daya tahan tubuh ikan harus melalui uji patogenisitas pada ikan atau menggunakan bakteri yang sudah dimatikan.

Dalam penelitian ini, sebagian bakteri proteolitik di saluran pencernaan ikan nila teridentifikasi sebagai anggota genus *Enterobacter*, yaitu *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, dan *Enterobacter ludwigii*. Tiga jenis bakteri *Enterobacter* termasuk dalam grup *Enterobacter cloacae* kompleks. Anggota grup ini terdiri atas antara lain *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter mori*, dan *Enterobacter nimipressuralis* (Davin-Regli et al., 2021). Genus *Enterobacter* umum ditemukan dalam saluran pencernaan hewan dan manusia, bersifat komensal dan sebagian dilaporkan sebagai bakteri patogen oportunistik pada tanaman, hewan, maupun manusia (Davin-Regli et al., 2021). Beberapa hasil penelitian menunjukkan *Enterobacter cloacae* dapat menyebabkan penyakit pada organisme akuatik. Aly et al. (2012) menemukan *Enterobacter cloacae* pada saluran pencernaan ikan nila yang dapat menyebabkan mortalitas 43% pada ikan tersebut ketika diinfeksi secara injeksi intraperitoneal. *Enterobacter cloacae* juga dilaporkan menyebabkan mortalitas tinggi pada zoea udang galah, *Macrobrachium rosenbergii* (Gao et al., 2019) dan menyebabkan pertumbuhan lambat pada udang galah dewasa (Gao et al., 2021).

Penelitian ini juga menemukan *Plesiomonas shigelloides* sebagai salah satu bakteri proteolitik di saluran pencernaan ikan nila. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan letak lahan budidaya ikan di daerah pedesaan di Indonesia yang berdampingan dengan lahan pertanian, yang menggunakan pupuk berupa kotoran hewan dan pupuk organik lain. Bakteri ini umum ditemukan pada ikan nila yang dibudidayakan menggunakan kotoran hewan tanpa diolah terlebih dahulu maupun pupuk organik (Martins et al., 2019). *Plesiomonas shigelloides* dilaporkan menyebabkan 60% kematian pada *silver carp* (*Hypophthalmichthys molitrix*) dengan gejala yang berkaitan dengan kerusakan ginjal (Behera et al., 2018).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Bakteri proteolitik ditemukan pada saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang dibudidayakan di Kabupaten Banyumas dengan proporsi yang bervariasi antar lokasi pengambilan sampel dan menurun ke arah posterior. Indeks aktifitas proteolitik bervariasi antar sampel. Hasil analisis sekuen 16S rDNA menunjukkan bakteri proteolitik saluran pencernaan ikan nila dalam penelitian terdiri atas 15 kelompok yang berdasarkan sekuen 16S rDNA memiliki kemiripan tinggi dengan *Pseudomonas aeruginosa* (4 isolat), *Plesiomonas shigelloides*, *Escherichia coli*, *Aeromonas veronii*, *Klebsiella variicola*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter hormaechei* (2 isolat), *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* dan *Bacillus* sp.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih mendalam mengenai bakteri

proteolitik yang didapatkan. Khususnya, penelitian mengenai pengembangan jenis bakteri yang memiliki potensi untuk dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik dan penanganan jenis bakteri yang dapat bersifat patogen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Fakultas Biologi dan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Jenderal Soedirman. Penelitian ini mendapat dukungan dari kegiatan penelitian skema peningkatan kompetensi dari Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Universitas Jenderal Soedirman (Nomor: Kept. 121/UN23.18/PT.01.05/2020) yang diajukan oleh Emyliana Listiowati, Hamdan Syakuri, Dewi Nugrayani, dan Anandita Ekasanti.

DAFTAR PUSTAKA

- Adeoye, A.A., R. Yomla, A. Jaramillo-Torres, A. Rodiles, D.L. Merrifield & S.J. Davies. 2016. Combined effects of exogenous enzymes and probiotics on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. *Aquaculture*. 463: 61-70. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.028>
- Algammal, A.M., M. Mabrok, E. Sivaramasamy, F.M. Youssef, M.H. Atwa, A.W. El-kholy, H.F. Hetta & W.N. Hozzein. 2020. Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor oprL and toxA virulence genes and blaTEM, blaCTX-M, and tetA antibiotic-resistance genes. *Sci. Rep.* 10: 15961. doi:10.1038/s41598-020-72264-4
- Ali, N.G., T.E.S. Ali, I.M. Aboyadak & M.A. Elbakry. 2021. Controlling *Pseudomonas aeruginosa* infection in *Oreochromis niloticus* spawners by Cefotaxime Sodium. *Aquaculture*. 544: 737107. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737107>
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers & D.J. Lipman. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Aly, S.M., W.G. Noun & M.M. Salem-Bekhit. 2012. Bacteriological and histopathological studies on enterobacteriaceae in Nile tilapia *Oreochromis Niloticus*. *J. Pharm. Biomed. Sci.* 2: 94-104.
- Armada, C.D & R.M.C. Simora. 2016. Isolation and identification of protease-producing *Pseudomonas* sp. PD14 in the gut of rabbitfish *Siganus guttatus* (Bloch 1787). *Asian Fish. Sci.* 29: 82-95.
- Askarian, F., Z. Zhou, R.E. Olsen, S. Sperstad & E. Ringø. 2012. Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and in vitro growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture*. 326-329: 1-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.016>
- Badan Pusat Statistik. 2017. Produksi Ikan di Kabupaten Banyumas (Ekor), 2014-2016 [WWW Document]. URL <https://banyumaskab.bps.go.id/indicator/56/90/1/pr> (accessed 11.21.21).
- Bairagi, A., K.S. Ghosh, S.K. Sen & A.K. Ray. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquac. Int.* 10: 109-121. doi:10.1023/A:1021355406412
- Baldissera, M.D., C.F. Souza, S.N. Descovi, C.M. Verdi, C.C. Zeppenfeld, L. de Lima Silva, A.L. Gindri, M.A. Cunha, R.C.V.

- Santos, B. Baldisserotto & A.S. da Silva. 2019. Effects of dietary grape pomace flour on the purinergic signaling and inflammatory response of grass carp experimentally infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Aquaculture*. 503: 217-224. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.015
- Banerjee, G., A. Nandi, S.K. Dan, P. Ghosh & A.K. Ray. 2017. Mode of association, enzyme-producing ability and identification of autochthonous bacteria in the gastrointestinal tract of two indian air-breathing fish, murrel (*Channa punctatus*) and stinging catfish (*Heteropneustes fossilis*). *Proc. Zool. Soc.* 70: 132-140. doi:10.1007/s12595-016-0167-x
- Behera, B.K., A.K. Bera, P. Paria, A. Das, P.K. Parida, S. Kumari, S. Bhowmick & B.K. Das. 2018. Identification and pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* in silver carp. *Aquaculture*. 493: 314-318. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.063
- Bereded, N.K., M. Curto, K.J. Domig, G.B. Abebe, S.W. Fanta, H. Waidbacher & H. Meimberg. 2020. Metabarcoding analyses of gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Awassa and Lake Chamo, Ethiopia. *Microorganisms*. doi:10.3390/microorganisms.8071040.
- Castresana, J. 2000. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17: 540-552. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334
- Chevenet, F., C. Brun, A.L. Bañuls, B. Jacq & R. Christen. 2006. TreeDyn: Towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *B.M.C. Bioinformatics* 7: 1-9. doi:10.1186/1471-2105-7-439
- Das, P., S. Mandal, A. Khan, S.K. Manna & K. Ghosh. 2014. Distribution of extracellular enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of four brackish water fish species. *Turkish J. Zool.* 38: 79-88. doi:10.3906/zoo-1205-3
- Davin-Regli, A., J.P. Lavigne & J.M. Pagès. 2021. *Enterobacter* spp.: Update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 32: e00002-19. doi:10.1128/CMR.00002-19
- Diwan, A.D., S.N. Harke, G. Gopalkrishna & A.N. Panche. 2021. Aquaculture industry prospective from gut microbiome of fish and shellfish: An overview. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. n/a. doi:https://doi.org/10.1111/jpn.13619
- F.A.O. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. doi:https://doi.org/10.4060/ca9229en
- Ganguly, S & A. Prasad. 2012. Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism. *Rev. Fish Biol. Fish.* 22: 11-16. doi:10.1007/s11160-011-9214-x
- Gao, X., H. Zhang, Q. Jiang, N. Chen, X. Li, X. Liu, H. Yang, W. Wei & X. Zhang. 2019. *Enterobacter cloacae* associated with mass mortality in zoea of giant freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* and control with specific chicken egg yolk immunoglobulins (IgY). *Aquaculture*. 501: 331-337. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.050.
- Gao, X., Y. Zhou, X. Zhu, H. Tang, X. Li, Q. Jiang, W. Wei & X. Zhang. 2021. *Enterobacter cloacae*: A probable etiological agent associated with slow growth in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. 530: 735826. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735826.
- Gascuel, O. 1997. BIONJ: An Improved Version of the N.J. Algorithm Based on A Simple Model of Sequence Data. *Mol. Biol. Evol.* 14, 685–695. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025808
- Giri, S.S., J.W. Jun, S. Yun, H.J. Kim, S.G. Kim, S.W. Kim, K.J. Woo, S.J. Han, W.T. Oh, J. Kwon, V. Sukumaran & S.C. Park. 2020. Effects of dietary heat-killed *Pseudomonas aeruginosa* strain VSG2 on immune functions, antioxidant efficacy, and disease resistance in *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*. 514: 734489. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734489
- Giri, S.S., S.S. Sen & V. Sukumaran. 2012. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol.* 32: 1135-1140. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.03.019
- Guo, T.-Y., W. Zhao, J.-Y. He, S.-Y. Liao, J.-J. Xie, S.-W. Xie, K. Masagounder, Y.-J. Liu, L.-X. Tian & J. Niu. 2020. Dietary dl-Methionyl-dl-Methionine supplementation increased growth performance, antioxidant ability, the content of essential amino acids and improved the diversity of intestinal microbiota in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Br. J. Nutr.* 123: 72-83. DOI: 10.1017/S0007114519002289.
- Kar, N., R.N. Roy, S.K. Sen & K. Ghosh. 2008. Isolation and characterization of extracellular enzyme-producing bacilli in the digestive tracts of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) and Murrel, *Channa punctatus* (Bloch). *Asian Fish. Sci.* 21: 421-434.
- Kuebutornye, F.K.A., Z. Wang, Y. Lu, E.D. Abarike, M.E. Sakyi, Y. Li, C.X. Xie & V. Hlordzi. 2020. Effects of three host-associated *Bacillus* species on mucosal immunity and gut health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and its resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 97: 83-95. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.046
- Kurniasih, T., A.M. Lusiastuti, Z.I. Azwar & I. Melati. 2014. Isolasi dan seleksi bakteri saluran pencernaan ikan lele sebagai upaya mendapatkan kandidat probiotik untuk efisiensi pakan ikan. *J. Ris. Akuakultur.* 9: 99. doi:10.15578/jra.9.1.2014.99-109.
- Lagacé, L., M. Pitre, M. Jacques & D. Roy. 2004. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2052-2060. doi:10.1128/AEM.70.4.2052-2060.2004.
- Li, J., J. Ni, J. Li, C. Wang, X. Li, S. Wu, T. Zhang, Y. Yu & Q. Yan. 2014. Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits. *J. Appl. Microbiol.* 117: 1750-1760. doi:10.1111/jam.12663.
- Maatallah, M., M. Vading, M.H. Kabir, A. Bakhrouf, M. Kalin, P. Nauclicr, S. Brisse & C.G. Giske. 2014. *Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the Stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae*. *PLoS One.* 9: e113539.

- Madigan, M. T., & J. M. Martinko 2006. Brock Biology of Microorganisms (Eleventh E). Pearson; Prentice Hall.
- Marchesi, J.R., T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom & W.G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 64: 795-799. doi:10.1128/aem.64.2.795-799.1998.
- Martins, A.F.M., T.L. Pinheiro, A. Imperatori, S.M. Freire, L. Sá-Freire, B.M. Moreira & R.R. Bonelli. 2019. *Plesiomonas shigelloides*: A notable carrier of acquired antimicrobial resistance in small aquaculture farms. Aquaculture. 500: 514-520. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.040.
- Mondal, S., T. Roy, S.K. Sen & A.K. Ray. 2008. Distribution of enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of some freshwater fish. Acta Ichthyol. Piscat. 38. 1-8. doi:10.3750/AIP2008.38.1.01.
- Mukherjee, A., A. Rodiles, D.L. Merrifield, G. Chandra & K. Ghosh. 2020. Exploring intestinal microbiome composition in three Indian major carps under polyculture system: A high-throughput sequencing-based approach. Aquaculture. 524: 735206. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735206.
- Pavel, A.B & C.I. Vasile. 2012. PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. B.M.C. Bioinformatics. 13: 9. doi:10.1186/1471-2105-13-9.
- Ray, A.K., K. Ghosh & E. Ringø. 2012. Enzyme-producing bacteria isolated from fish Gut: A review. Aquac. Nutr. 18: 465-492. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x.
- Ray, A.K., T. Roy, S. Mondal & E. Ringø. 2010. Identification of gut-associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of indian major carps. Aquac. Res. 41. 1462-1469. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02437.x.
- Ringø, E., Z. Zhou, J.L.G. Vecino, S. Wadsworth, J. Romero, A. Krogdahl, R.W. Olsen, A. Dimitroglou, A. Foey, S. Davies, M. Owen, H.L. Lauzon, L.L. Martinsen, P. De Schryver, P. Bossier, S. Sperstad & D.L. Merrifield. 2016. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? Aquac. Nutr. 22: 219-282. doi:10.1111/anu.12346.
- Romero, J., E. Ringø & D.L. Merrifield. 2014. The gut microbiota of fish. Aquac. Nutr., Wiley Online Books. doi:https://doi.org/10.1002/9781118897263.ch4.
- Standen, B.T., A. Rodiles, D.L. Peggs, S.J. Davies, G.A. Santos & D.L. Merrifield. 2015. Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99: 8403-8417. doi:10.1007/s00253-015-6702-2.
- Su, S., B.P. Munganga, F. Du, J. Yu, J. Li, F. Yu, M. Wang, X. He, X. Li, R. Bouzoualegh, P. Xu & Y. Tang. 2020. Relationship between the fatty acid profiles and gut bacterial communities of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) from ecologically different habitats. Frontiers in microbiology, 11, 565267. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.565267.
- Tachibana, L., G.S. Telli, D. De-C. Dias, G.S. Gonçalves, M.C. Guimarães, C.M. Ishikawa, R.B. Cavalcante, M.M. Natori, M.F. Fernandez-Alarcon, S. Tapia-Paniagua, M.A. Moriñigo, F.J. Moyano, E.R.L. de Araújo & M.J.T. Ranzani-Paiva. 2021. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): effects on Growth Performance, Gut Microbiota Modulation and Innate Immunology. Aquac. Res. 52. 1630-1642. doi:https://doi.org/10.1111/are.15016.
- Talukdar, S., E. Ringø & K. Ghosh. 2016. Extracellular tannase-producing bacteria detected in the digestive tracts of freshwater fishes (Actinopterygii: Cyprinidae and Cichlidae). Acta Ichthyol. Piscat. 46. 201-210.
- Talwar, C., S. Nagar, R. Lal & R.K. Negi. 2018. Fish gut microbiome: current approaches and future perspectives. Indian J. Microbiol. 58: 397-414. doi:10.1007/s12088-018-0760-y.
- Tóth, E.M., A.K. Borsodi, T. Felföldi, B. Vajna, R. Sipos & K. Márialigeti. 2013. Practical Microbiology: based on the Hungarian practical notes entitled "Mikrobiológiai Laboratóriumi Gyakorlatok." Eötvös Loránd University, Hungary.
- Wang, A.R., C. Ran, E. Ringø & Z.G. Zhou. 2018. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. Rev. Aquac. 10: 626-640. doi:https://doi.org/10.1111/raq.12191.
- Xia, Y., E. Yu, M. Lu & J. Xie. 2020. Effects of probiotic supplementation on gut microbiota as well as metabolite profiles within Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. 527: 735428. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735428.
- Zainuddin, M., W.A. Setyati & P.P. Renta. 2018. Zona hidrolisis dan pertumbuhan bakteri proteolitik dari sedimen ekosistem mangrove *Rhizophora mucronata* Telukawur-Jepara. Akuatik J. Sumberd. Perair. 11: 31-35. doi:10.33019/akuatik.v11i2.241.