

TUGAS AKHIR PROGRAM MAGISTER (TAPM)

**VIABILITAS DAN PATOGENITAS *Edwardsiella tarda*
PADA IKAN LELE DUMBO (*Clarias gariepinus*)
YANG DIBEKUKAN PADA SUHU -20°C**



**TAPM Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
Gelar Magister Sains dalam Ilmu Kelautan
Bidang Minat Manajemen Perikanan**

Disusun Oleh :

IWAN SUPRIADI

NIM. 015982936

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS TERBUKA
JAKARTA
2012**

ABSTRAK**VIABILITAS DAN PATOGENITAS *Edwardsiella tarda*
PADA IKAN LELE DUMBO (*Clarias gariepinus*)
YANG DIBEKUKAN PADA SUHU -20 °C****Iwan Supriadi****Universitas Terbuka
supriadi.iwan@gmail.com****Kata Kunci : *Edwardsiella tarda*, suhu -20 °C, Viabilitas , Patogenitas**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui viabilitas dan patogenitas dari bakteri *Edwardsiella tarda* pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang dibekukan dan disimpan pada suhu -20 °C selama 10, 20 dan 30 hari. Viabilitas bakteri *Edwardsiella tarda* diuji dengan mengkultur kembali *Edwardsiella tarda* dari organ daging ikan lele dumbo beku kemudian dilakukan uji karakteristik biokimia, pewarnaan Gram dan uji biomolekuler dengan metode *Polimerase Chain Reaction* (PCR) serta dilakukan penghitungan jumlah koloni bakteri dengan metode TPC (*Total Plate Count*). Patogenitas bakteri *Edwardsiella tarda* diuji dengan cara menyuntikkan kultur bakteri *Edwardsiella tarda* yang berasal dari ikan lele dumbo beku yang disimpan pada suhu -20 °C ke ikan lele dumbo ukuran 7-8 cm secara intramuskular sebanyak 0,05 ml dengan dosis 10⁸ CFU/ml (standar Mc. Farland), kemudian dipelihara dan diamati selama 15 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *Edwardsiella tarda* pada ikan lele dumbo yang disimpan dalam suhu -20 °C masih bertahan hidup dan masih bersifat patogen terhadap ikan lele dumbo hidup. Infeksi dari isolat *Edwardsiella tarda* dengan masa penyimpanan 10 hari menimbulkan mortalitas sebesar 95%, 20 hari sebesar 80,83% dan 30 hari sebesar 61,67% dari total ikan uji tiap perlakuan. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa lama masa penyimpanan pada suhu -20 °C memberikan pengaruh yang nyata terhadap viabilitas dan patogenitas dengan kecenderungan semakin lama masa penyimpanan semakin menurun tingkat viabilitas dan patogenitasnya.

ABSTRACT**VIABILITY AND PATHOGENECITY OF *Edwardsiella tarda*
IN FROZEN AFRICAN CATFISH (*Clarias gariepinus*)
WHICH STORED AT TEMPERATURE OF -20 °C**

Iwan Supriadi
The Open University of Indonesia
supriadi.iwan@gmail.com

Keywords: *Edwardsiella tarda*, temperature -20 °C, viability, pathogenicity

The purpose of this study is to determine the viability and pathogenicity of the *Edwardsiella tarda* in fish African catfish (*Clarias gariepinus*) which have frozen and stored at -20 °C for 10, 20 and 30 days. Viability of *Edwardsiella tarda* bacteria was tested by culturing *Edwardsiella tarda* that isolated from the meat of frozen African catfish. Several examination then was carried out to the cultured *Edwardsiella tarda* included biochemical characteristics test, Gram staining, biomolecular test using Polymerase Chain Reaction (PCR) method and bacterial colony counters using TPC (Total Plate Count) method. Pathogenicity of *Edwardsiella tarda* was tested by injecting cultured *Edwardsiella tarda* that isolated from frozen African catfish that was stored at temperature of -20 °C to 7-8 cms African catfish in size as much as 0.05 ml intramuscularly at a dose of 10⁸ CFU / ml (standard Mc. Farland), then maintained and observed for 15 days. The results showed that the *Edwardsiella tarda* in frozen African catfish that was stored in a temperature of -20 °C were still alive and still pathogenic to live African catfish. Infection of *Edwardsiella tarda* isolates with 10-day storage period could cause mortality by 95%, 80.83% for 20 days storage period and 61.67% for 30 days storage period from the total fish per treatment. The analysis showed that the longer period of storage at a temperature of -20 °C would give a significant influence on viability and pathogenicity with the tendency that longer storage period could decreased the viability and pathogenicity of *Edwardsiella tarda* infection.

**UNIVERSITAS TERBUKA
PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI ILMU KELAUTAN
BIDANG MINAT MANAJEMEN PERIKANAN**

PERNYATAAN

TAPM yang berjudul
Viabilitas dan Patogenitas Edwardsiella ictaluri
pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*)
yang Dibekukan pada Suhu -20 °C
Adalah hasil karya sendiri, dan seluruh sumber yang dikutip
maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.
Apabila di kemudian hari ternyata ditemukan adanya penjiplakan (plagiat),
maka saya bersedia menerima sanksi akademik.

JAKARTA, 28 JULI 2012

Yang Menyatakan,



(Iwan Supriadi)
NIM. 015982936

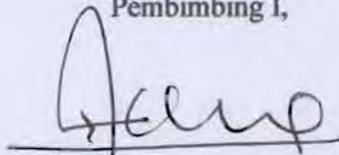
LEMBAR PERSETUJUAN TAPM

Judul TAPM : Viabilitas dan Patogenitas *Edwardsiella tarda* pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang Dibekukan pada Suhu -20^oC

Penyusun TAPM : Iwan Supriadi
 NIM. : 015982936
 Program Studi : Magister Manajemen Perikanan
 Hari/Tanggal : Sabtu / 28 Juli 2012

Menyetujui :

Pembimbing I,



DR. Ir. Joko Santoso, M.Si
 NIP. 196709221992031003

Pembimbing II,



DR. Sandra S.A. M.Pd. M.Ed
 NIP. 195901051985032001

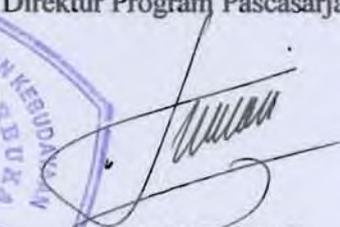
Mengetahui,

Ketua Bidang Ilmu/
 Program Magister Ilmu kelautan
 Bidang Minat Manajemen Perikanan,



DR. Ir. Nurhasanah, M.Si
 NIP. 196311111988032001

Direktur Program Pascasarjana,

Suciati, M.Sc. Ph.D
 NIP. 195202131985052001

**UNIVERSITAS TERBUKA
PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI ILMU KELAUTAN
BIDANG MINAT MANAJEMEN PERIKANAN**

PENGESAHAN

Nama : Iwan Supriadi
 NIM. : 015982936
 Program Studi : Magister Ilmu Kelautan Bidang Minat Manajemen Perikanan
 Judul TAPM : Viabilitas dan Patogenitas *Edwardsiella tarda* pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang Dibekukan pada Suhu -20⁰ C

Telah dipertahankan di hadapan Sidang Panitia Penguji TAPM Program Pascasarjana, Program Studi Ilmu Kelautan Bidang Minat Magister Manajemen Perikanan, Universitas Terbuka pada:

Hari/Tanggal : Sabtu, 28 Juli 2012
 Waktu : 15.00 WIB – 17.00 WIB

Dan telah dinyatakan : LULUS

PANITIA PENGUJI TAPM

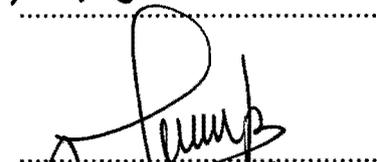
Ketua Komisi Penguji
 Ir. Adi Winata, M.Si.

:



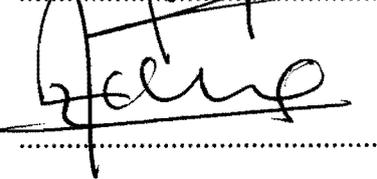
Penguji Ahli
 Dr. Ir. Chandra Nainggolan, M.Sc.

:



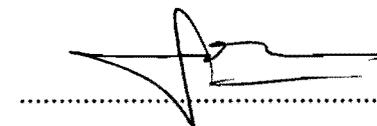
Pembimbing I
 Dr. Ir. Joko Santoso, M.Si

:



Pembimbing II
 Dr. Sandra Sukmaning A, M.Pd, M.Ed.

:



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah Subhanahuwata'ala, atas segala rahmat, hidayah serta kesempatan yang telah diberikan-Nya kepada penulis, sehingga penulis dapat menempuh pendidikan “Magister Manajemen Perikanan” sampai dengan penyelesaian Tugas Akhir Program Magister (TAPM). Penulis melaksanakan penelitian dan penulisan TAPM dengan judul “Viabilitas dan Patogenitas *Edwardsiella tarda* pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang Dibekukan pada Suhu -20°C ”. Penulis berharap dengan hasil dari TAPM ini, masyarakat pembudidaya ikan khususnya dan masyarakat lain umumnya dapat mengetahui tingkat keganasan dari bakteri *Edwardsiella tarda* baik bagi ikan budidaya maupun bagi manusia dan bersama-sama mencegah penyebarannya.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Bapak Dr. Ir. Joko Santoso, M.Si selaku pembimbing I dan Ibu Dr. Sandra Sukmaning Adji, M.Pd, M.Ed., selaku pembimbing II, yang telah berkenan memberikan arahan dan bimbingan kepada penulis untuk menyelesaikan TAPM ini. Selanjutnya penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Ketua Komisi Penguji, dosen Penguji Ahli, Ibu Suciati, M.Sc, Ph.D. selaku Direktur Program Pascasarjana dan Ibu Dr. Ir. Nurhasanah, M.Si., selaku Ketua Bidang Ilmu/Program Magister Ilmu Kelautan Bidang Minat Manajemen Perikanan yang telah membantu penulis selama menempuh pendidikan Pascasarjana dan juga turut memberikan masukan untuk penyempurnaan TAPM ini.

Rasa terima kasih yang tak terhingga juga penulis sampaikan kepada :

1. Bapak Ir, Muhammad Ridwan, MM, MP., selaku Kepala Pusat Karantina Ikan yang telah memberikan dorongan dan semangat kepada penulis untuk dapat menyelesaikan pendidikan Pascasarjana.
2. Bapak Rusnanto, S.Pi, M.Si., selaku Kepala Balai Karantina Ikan Kelas II Tanjung Priok, yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk mempergunakan fasilitas laboratorium.
3. Tri Utami Widiastuti, Kusnadi, Patulloh, Agung dan teman-teman yang bertugas di Laboratorium Karantina Ikan Tanjung Priok.
4. Isteri dan anak-anakku tersayang, yang selalu memberikan dorongan semangat kepada penulis dalam masa studi dan penulisan TAPM ini serta rekan-rekan yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa TAPM ini masih belum sempurna dan masih harus ditindaklanjuti dengan penelitian-penelitian lanjutan. Semoga TAPM ini bermanfaat bagi penentu kebijakan dan bagi kita semua, Amin.

Jakarta, 28 Juli 2012

Iwan Supriadi

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
Daftar Isi	v
Daftar Gambar	vii
Daftar Tabel	viii
Daftar Lampiran	ix
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. <i>Edwardsiella tarda</i>	6
B. Viabilitas dan Patogenitas	11
C. Lingkungan	14
D. Ikan Lele Dumbo (<i>Clarias gariepinus</i>)	16
E. Pembekuan Ikan dan Pengangkutan Ikan Beku	19
F. Kerangka Berfikir	21
G. Hipotesis	24
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
A. Tempat dan Waktu Penelitian	25
B. Alat dan Bahan Penelitian	25
C. Metode Penelitian	27
1. Uji Pendahuluan	27
2. Uji Utama	28
D. Analisis Data	38
1. Rancangan Percobaan	38
2. Parameter Utama yang Diamati	40
BAB IV TEMUAN DAN PEMBAHASAN	
A. Penelitian Pendahuluan	42
1. Pemeriksaan Ikan Lele Dumbo	42
2. Identifikasi Bakteri dari Isolat	44
B. Penginfeksian Ikan Lele Dumbo	47
1. Penginfeksian <i>Edwardsiella tarda</i> ke Ikan Lele Dumbo	47
2. Penghitungan Jumlah Koloni Bakteri <i>Edwardsiella Tarda</i>	50
3. Penyimpanan pada Suhu -20 ^o C	51

	C. Viabilitas.....	52
	D. Patogenitas.....	56
	E. Parameter Kualitas Air.....	64
	F. Pembahasan.....	64
	KESIMPULAN DAN SARAN	
BAB V	A. Kesimpulan.....	67
	B. Saran.....	67
	DAFTAR PUSTAKA.....	69

UNIVERSITAS TERBUKA

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1. Kerangka Berfikir	21
2.2. Diagram Alir Langkah Kerja Pemeriksaan Ikan Uji	22
2.3. Diagram Alir Langkah Kerja Identifikasi Bakteri	22
2.4. Diagram Alir Langkah Kerja Uji Utama	23
3.1. Bagan Penelitian	40
3.2. Alat Pengujian Parameter Kualitas Air (<i>Multi Water Quality Checker</i>).....	41
4.1. Morfologi Koloni <i>Edwardsiella tarda</i> pada Media TSA	43
4.2. Hasil Uji PCR Ikan Lele Dumbo.....	44
4.3. Pewarnaan Gram Isolat <i>Edwardsiella tarda</i> (Pembesaran 1000 kali).	46
4.4. Hasil Uji PCR Isolat <i>Edwardsiella tarda</i>	46
4.5. Gejala Klinis Ikan Lele Dumbo yang Terserang <i>Edwardsiella tarda</i>	49
4.6. Hasil Uji PCR Ikan Lele Dumbo yang Diinfeksi <i>Edwardsiella tarda</i>	50
4.7. Hasil Uji PCR Ikan Lele Dumbo yang Disimpan Selama 10, 20 dan 30 Hari	53
4.8. Grafik Logaritma Koloni Bakteri <i>Edwardsiella tarda</i> (CFU/gram) pada Ikan Lele Beku Setelah Penyimpanan Suhu -20 °C Selama 10, 20 dan 30 Hari	54
4.9. Gejala Klinis Ikan Lele Dumbo Ukuran 7-8 cm Selama Pengamatan	59
4.10. Grafik Laju Mortalitas Ikan Lele Dumbo Setiap Hari Selama Pengamatan	60
4.11. Grafik Persentase Mortalitas Ikan Lele Dumbo Selama Pengamatan	62

DAFTAR TABEL

	Halaman
1.1. Sifat Karakteristik Biokimia <i>Edwardsiella tarda</i>	10
3.1. Komposisi Reagen yang Digunakan pada Proses Amplifikasi	33
3.2. Siklus yang Dijalankan pada Proses Amplifikasi	34
4.1 Hasil Pembacaan Uji Karakteristik Biokimia Isolat <i>Edwardsiella tarda</i>	45
4.2 Rata-rata Panjang dan Berat Ikan Lele Dumbo yang Diinfeksi	48
4.3. Jumlah Total Koloni Bakteri <i>Edwardsiella tarda</i> (CFU/gram) dalam Organ Daging Ikan Lele Dumbo Sebelum Disimpan pada Suhu -20 °C	51
4.4. Jumlah Total Koloni Bakteri <i>Edwardsiella tarda</i> (CFU/g) dalam Organ Daging Ikan Lele Dumbo Sebelum Disimpan pada Suhu -20 °C Selama Masa Penyimpanan 10, 20 dan 30 hari	54
4.5. Analisis Ragam (Anova) Pengaruh Perlakuan Terhadap Jumlah Total Koloni Bakteri <i>Edwardsiella tarda</i>	55
4.6. Gejala Klinis Ikan Lele Dumbo Ukuran 7-8 cm Selama Pengamatan	59
4.7. Analisis Ragam (Anova) Pengaruh Perlakuan Terhadap Mortalitas Ikan Uji	62
4.8. Kisaran Hasil Pengukuran Kualitas Air Selama Penelitian.....	64

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Perhitungan Analisis Data Jumlah Koloni Bakteri *Edwardsiella tarda* (CFU/gram) pada Ikan Lele Dumbo Beku dengan Masa Penyimpanan 10, 20 dan 30 Hari.
- Lampiran 2. Perhitungan Analisis Data Mortalitas Ikan Lele Dumbo Ukuran 7-8 cm Selama 15 Hari Pengamatan.
- Lampiran 3 Foto-foto Penelitian
- Lampiran 4 Biodata Penulis

UNIVERSITAS TERBUKA

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Budidaya perikanan mempunyai peranan yang penting dan strategis dalam pembangunan perekonomian nasional, dalam meningkatkan perluasan kesempatan kerja dan peningkatan taraf hidup pada umumnya. Pemerintah dalam hal ini Kementerian Kelautan dan Perikanan dengan pihak-pihak yang berkompeten yang didalamnya, para petani ikan, pembudidaya dan pelaku-pelaku usaha bersinergi untuk mencapai tujuan tersebut.

Dalam dunia perikanan budidaya, khususnya budidaya perikanan air tawar, ikan lele adalah salah satu pilihan komoditas yang diunggulkan bagi para pelaku usaha dan petani ikan. Hal ini terbukti dengan ditetapkannya komoditas lele sebagai komoditas unggulan di beberapa daerah minapolitan khususnya sektor budidaya, seperti di daerah Bandung, Bogor, Magelang, Pacitan, dan Sidoarjo. Dari Kecamatan Parung Kabupaten Bogor saja tidak kurang dari 3.000 ton lele konsumsi yang dihasilkan tiap bulannya.

Ada beberapa alasan para pelaku pembudidaya ikan sehingga budidaya ikan lele ini menjadi pilihan usahanya, diantaranya adalah tingkat permintaan konsumen dari waktu ke waktu selalu meningkat yang artinya minat konsumen akan kebutuhan ikan ini sangat tinggi, teknik budidaya yang tidak terlalu sulit, tingginya tingkat produktifitas lahan per satuan luasnya (intensifikasi lahan), tidak memerlukan suplay air yang terlalu besar, serta masa produksi yang tidak terlalu lama sehingga perputaran uangnya relatif cepat (Khairuman & Amri, 2002). Selain itu dibandingkan dengan jenis ikan lele lain, ikan lele

dumbo memiliki keunggulan yaitu pertumbuhannya relatif lebih cepat, mudah berkembang biak, cepat beradaptasi dengan lingkungan baru, dan selalu merespon pakan yang diberikan (Khairuman & Amri, 2011).

Ada beberapa kendala yang sering ditemukan dalam mencapai target produksi, salah satunya masalah penyakit. Bakteri *Edwardsiella tarda* merupakan penyebab utama penyakit *Edwardsiellosis* yang telah dikenal sebagai patogen utama pada budidaya catfish di USA. Pada umumnya perkembangan dari *Edwardsiella tarda* sangat lambat. Pada beberapa kasus kematian ikan akibat serangan bakteri ini sangat rendah yaitu kurang dari 5 %, tetapi pada saat ini gejala penyakit tampak nyata dan menimbulkan kematian hingga 50 %. Salah satu faktor terjadinya serangan *Edwardsiella tarda* adalah karena ikan stress, terutama akibat padat tebar tinggi, kualitas air yang tidak baik, dan tingginya kandungan bahan organik di air. Infeksi *Edwardsiella tarda* pada ikan sidat di alam, penyakit *Edwardsiellosis* dapat menyebabkan mortalitas sampai dengan 80 % (Kodama, et al., 1987 dalam Septiama, dkk., 2008).

Peningkatan produksi lele dan peningkatan konsumsi lele berpengaruh dengan semakin sering dilakukannya pengiriman lele ukuran konsumsi ke daerah-daerah. Dari data pengiriman domestik keluar Balai Karantina Ikan Kelas II Tanjung Priok selama tahun 2010 tercatat telah terjadi pengiriman ikan lele beku ukuran konsumsi sebanyak 175.000 kg ke daerah Sorong, Timika, Batam, dan Pontianak. Pengiriman lele beku ukuran konsumsi ini dilakukan dengan menggunakan *container reefer* dengan suhu -20°C .

Pengiriman lele beku ukuran konsumsi ke daerah-daerah ini berpeluang membawa dan menyebarkan bakteri *Edwardsiella tarda* penyebab penyakit *Edwardsiellosis* yang dapat mengganggu produksi petani budidaya.

B. Perumusan Masalah

Pengiriman lele konsumsi dalam keadaan beku ke daerah-daerah membuka peluang tersebarnya *Edwardsiella tarda*, penyebab penyakit *edwardsiellosis* pada ikan. *Edwardsiella tarda* ini juga dilaporkan dapat menimbulkan penyakit pada manusia, seperti penyakit *gastroenteritis* (radang lambung/usus), infeksi luka seperti selulitis atau gangren gas berhubungan dengan trauma pada permukaan mukosa/selaput lendir, dan meningitis (Janda & Abbot, 1993).

Bakteri *Edwardsiella tarda* merupakan bakteri Gram negatif yang selain bersifat patogen, diketahui memiliki kemampuan bertahan hidup dengan kondisi inaktif pada suhu rendah $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ s/d $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Meng du, *et al.*, 2007). Brady & Vinitnantharant (1990) berhasil mengisolasi dan mengkultur bakteri patogen dari ikan channel catfish (*Ictalurus punctatus*) yang disimpan lebih dari 20 hari pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Penelitian yang dilakukan oleh Setyaningsih, dkk. (2008). *Edwardsiella tarda* masih dapat bertahan hidup khususnya di daging dan ginjal ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) ukuran 250 gram/ekor yang disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai dengan penyimpanan hari ke 32. Jumlah bakteri yang ditemukan pada daging sebanyak $2,88 \times 10^6$ CFU/g dan pada ginjal sebanyak $8,10 \times 10^4$ CFU/g.

Belum diketahui dengan pasti apakah bakteri *Edwardsiella tarda* di dalam ikan lele (*Clarias gariepinus*) yang dibekukan pada suhu -20°C masih dapat bertahan hidup dan memiliki kemampuan untuk menginfeksi kembali ikan lele hidup.

Dari permasalahan diatas, maka timbul pernyataan penelitian yaitu :

1. Bagaimana Viabilitas (daya tahan/kemampuan bertahan hidup) bakteri *Edwardsiella tarda* setelah disimpan pada suhu -20°C pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*), selama 10, 20 dan 30 hari (perkiraan masa penyimpanan dan pengangkutan).
2. Bagaimana Patogenitas (kemampuan untuk menyebabkan sakit) bakteri *Edwardsiella tarda* setelah disimpan pada suhu -20°C pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*), selama 10, 20 dan 30 hari (perkiraan masa penyimpanan dan pengangkutan).

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui Viabilitas *Edwardsiella tarda* setelah disimpan pada suhu -20°C pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*), selama 10, 20 dan 30 hari.
2. Mengetahui Patogenitas *Edwardsiella tarda* setelah disimpan pada suhu -20°C pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*), selama 10, 20 dan 30 hari.

D. Manfaat Penelitian

Dengan mengetahui viabilitas dan patogenitas dari *Edwardsiella tarda*, diharapkan dapat dijadikan dasar bagi penentu kebijakan dalam pembatasan penyebaran *Edwardsiella tarda* yang dapat mempengaruhi produksi perikanan khususnya ikan lele bagi daerah-daerah yang diketahui belum terdapat *Edwardsiella tarda*.

Disamping itu pula dengan mengetahui viabilitas dari *Edwardsiella tarda*, diharapkan pengolahan ikan lele untuk kebutuhan konsumsi manusia dapat dilakukan dengan prosedur yang benar untuk menjamin keamanan pangan agar terhindar dari penyakit infeksi yang dapat ditimbulkan oleh *Edwardsiella tarda*.

UNIVERSITAS TERBUKA

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

A. *Edwardsiella tarda*

Edwardsiella tarda merupakan penyebab penyakit bakteri yang paling serius pada budidaya ikan dan dilaporkan juga menyerang kelompok ikan air tawar, laut, beberapa jenis reptilia dan mamalia laut, yaitu : channel catfish (*Ictalurus punctatus*), chinook salmon (*Onchorynchus tshawytscha*), common carp (*Cyprinus carpio*), crimson seabream (*Evynnis japonicus*), japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), japanese eel (*Anguilla japonica*), largemouth bass (*Micropterus salmoides*), mullet (*Mugil cephalus*), red sea bream (*Chrysophrys major*), striped bass (*Morone saxatilis*), tilapia (*Tilapia nilotica*), yellow tail (*Seriolla quinquiradiata*), ular, buaya dan singa laut (Afrianto & Liviawaty, 1992).

Bakteri *Edwardsiella tarda* dilaporkan juga dapat menjadi patogen bagi manusia. Infeksi yang terkait dengan spesies ini antara lain gastroenteritis (radang lambung/usus), infeksi luka seperti selulitis atau gangren gas berhubungan dengan trauma pada permukaan mukosa/selaput lendir, dan meningitis. Faktor penyebab dari infeksi *Edwardsiella tarda*, yaitu paparan dari lingkungan perairan atau hewan peliharaan (jenis reptil atau amfibi), maupun dari kebiasaan memakan ikan mentah yang mengandung bakteri *Edwardsiella tarda* (Janda & Abbot, 1993).

Edwardsiella tarda, adalah salah satu jenis bakteri Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK) yang telah ditetapkan menurut Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan nomor: KEP.03/MEN/2010 tentang Penetapan Jenis-jenis

Hama Penyakit Ikan Karantina, Golongan, Media Pembawa dan Sebarannya. Dalam keputusan menteri tersebut juga ditetapkan bahwa *Edwardsiella tarda* adalah jenis bakteri HPIK golongan II dan ikan inang defenitifnya adalah Channel catfish (*Ictalurus punctatus*), Sidat (*Anguila spp*), Nila (*Oreochromis spp*), Lele (*Clarias spp*), Labi-labi (*Amyda cartilaginea*), Mas koki (*Carrasius auratus*), Gurame (*Osphronemus gurame*), Molusca , Alligator (*Alligator mississippiensis*), Patin (*Pangasius spp*), Red Sea Bream (*Pagrus major*), Kura-kura Brazil (*Acanthochelys radiolata*), Kura-kura Hijau (*Trachemys scripta elegans*), dan jenis-jenis ikan air tawar atau laut lainnya dapat menjadi inang antara / carrier.

Bakteri *Edwardsiella tarda* merupakan penyebab penyakit Edwardseilosis / *Emphisemathous Putrefactive Disease of Catfish* (EPDC) atau *Edwardsiella Septicaemia* (ES). Bakteri *Edwardsiella tarda* sudah tersebar di beberapa negara yaitu Eropa, Thailand, Amerika Serikat, Malaysia, Asia, Canada, dan Australia. Di Indonesia *Edwardsiella tarda* ditemukan di DI Yogyakarta, Kalimantan Barat, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jambi, Bangka Belitung, Kalimantan Tengah, Sulawesi Tengah, DKI Jakarta dan Sumatera Barat (Biro Hukum, 2010).

Edwardsiella tarda disebabkan oleh bakteri dari genus *Edwardsiella* dan umumnya menyerang species-species ikan di daerah tropis. *Edwardsiella tarda* berbentuk batang pendek, Gram negatif, non acid fast, motil, tidak membentuk spora dan tidak membentuk kapsul, termasuk dalam kelompok *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini hidup secara alamiah di perairan tawar dan

laut khususnya pada perairan yang banyak mengandung bahan organik dan juga lumpur. Beberapa inang alamiah bisa bertahan sebagai carier dan penularannya secara horizontal yaitu kontak antara inang satu dengan inang lain melalui media air. Bakteri *Edwardsiella tarda* ini juga merupakan bakteri yang zoonosis dan dapat menyebabkan penyakit *gastrointestinae* dan *extraintestinae* atau diare yang akut pada manusia (Plumb, 1993).

Menurut Hawke (1979) dalam Austin dan Austin (1987), morfologi koloni koloni bakteri *Edwardsiella tarda* adalah : permukaan rata, berbentuk bundar, diameter 2 mm, sedikit cembung, tepi rata, perkembangan koloni tidak menghasilkan pigmen, koloni transparan, suhu optimal 35 °C dan tidak tumbuh pada suhu < 10 °C atau > 45 °C. Waktu pembelahan Bakteri *Edwardsiella tarda* tiap 34 menit.

Sifat uji biokimia *Edwardsiella tarda*, pada media agar Triple Sugar Iron Agar (TSIA) miring ternyata *Edwardsiella tarda* mampu memfermentasi glukosa dan menghasilkan gas H₂S dan pada uji O/F (oksidatif fermentatif) yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan suatu bakteri mengurai karbohidrat (glukosa) menggunakan media OF basal medium terbukti *Edwardsiella tarda* menimbulkan reaksi (+) yang artinya bakteri tersebut mampu untuk mengurai glukosa. Pada uji oksidase yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri untuk memproduksi cytochrome oksidase menunjukkan reaksi (-). Bakteri *Edwardsiella tarda* menunjukkan reaksi (+) pada uji katalase yang artinya *Edwardsiella tarda* mampu menghasilkan enzim katalase. Pada uji indole, *Edwardsiella tarda* menunjukkan reaksi (+)

yang artinya mampu untuk mengurai tryptophan menjadi indole. *Edwardsiella tarda* menunjukkan reaksi (+) pada uji methyl red (MR-Vp test) yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri mengasamkan glukosa dan mengurainya lebih lanjut menjadi acetylmethyl carbinol atau acetoin-butanodiol. Tetapi pada uji citrate yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan tumbuh bakteri dalam menggunakan sumber carbon dari senyawa citrat menunjukkan reaksi (-). Pada uji lysine decarboxylase yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mengurai asam amino menjadi amine, juga menunjukkan reaksi (+) dan pada uji ornithine decarboxylase yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mengurai ornithine (asam amino) menjadi amine juga menunjukkan reaksi (+). Sedangkan pada uji gelatin hydrolisis, yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim gelatinase dalam menghidrolisa gelatin menjadi asam amino dan uji urease yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim urease menunjukkan reaksi (-). Pada uji fermentasi karbohidrat yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi gula-gula/karbohidrat tertentu, menunjukkan reaksi (+) untuk glukosa, maltosa dan trehalosa dan menunjukkan reaksi (-) untuk laktosa, maltosa, arabinosa, raffinosa, rhamnosa dan xilosa (Lehninger, 1995).

Menurut Faddin (1980) dan Austin & Austin (2007) dalam Anonim (2007), sifat karakteristik biokimia *Edwardsiella tarda* dapat dilihat pada Tabel 1.1.

Tabel 1.1. Sifat Karakteristik Biokimia *Edwardsiella tarda*

Karakter Uji Biokimia	Hasil	
	*)	**)
Produksi H ₂ S	+	+
Oksidatif/ Fermentatif (OF)	F	F
Oksidase	-	-
Katalase	+	+
Motility	+	+
Indol	+	+
Methyl Red	+	+
Voges Proskauer	-	-
Simmons citrate	-	-
Arginin dihydrolase	-	-
Lysine decarboxylase	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+
Gelatin hydrolysis	-	-
Urea hydrolysis	-	-
Glukosa	+	+
Laktosa	-	-
Sukrosa	-	-
Maltosa	+	+
Manitol	-	-
Salicin	-	-
Sorbitol	-	-
Arabinosa	-	-
Raffinosa	-	-
Rhamnosa	-	-
Trehalosa	+	+
Xylosa	-	-

Keterangan : *) Faddin (1980), **) Austin & Austin (2007)

Menurut Septiama, dkk. (2008) gejala klinis ikan yang terserang *Edwardsiella tarda*, adalah :

- a. Pada infeksi ringan penyakit ini hanya menampilkan luka-luka kecil dengan ukuran 3 – 5 mm pada samping bagian belakang tubuh (*posteriolateral*).

- b. Sebagai perkembangan lebih lanjut, luka bernanah berkembang dalam otot rusuk dan lambung yang apabila dibuka mengeluarkan gas H₂S.
- c. Pada kasus akut, luka bernanah secara cepat bertambah dalam berbagai ukuran. Perkembangan lebih lanjut luka-luka (rongga-rongga) tersebut berisi gas dan terlihat bentuk cembung menyebar ke seluruh tubuh.
- d. Ikan kehilangan warna dan luka-luka kemudian merata ke seluruh tubuh.
- e. Ikan cenderung akan kehilangan kontrol pada tubuh bagian belakang.

Klasifikasi bakteri *Edwardsiella tarda* menurut Mac.Faddin (1980)

adalah sebagai berikut:

Kingdom	:	Eubacteria
Subkingdom	:	Prokayota
Filum	:	Proteobacteria
Divisi	:	Protophta
Kelas	:	Schizomycetes
Ordo	:	Pseudomonadales
Subordo	:	Thiorhodaceae
Famili	:	Enterobacteriaceae
Genus	:	<i>Edwardsiella</i>
Spesies	:	<i>Edwardsiella tarda</i>

B. Viabilitas dan Patogenitas

Viabilitas menurut Kamus Besar Bahasa Indonesia (Anonim, 2005), pengertiannya adalah kemungkinan untuk dapat hidup atau kemampuan untuk dapat bertahan hidup.

Hastuti (2007) dalam Anonim (2008) menyatakan bahwa terdapat beberapa faktor abiotik yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri, antara lain : suhu, kelembaban, cahaya, pH, dan nutrisi. Apabila faktor-faktor abiotik tersebut memenuhi syarat sehingga optimum untuk pertumbuhan bakteri, maka bakteri dapat tumbuh dan berkembang biak.

Patogen adalah organisme yang dapat menimbulkan penyakit. Organisme yang berperan sebagai patogen dalam timbulnya penyakit bakterial adalah bakteri. Patogenitas merupakan kemampuan organisme untuk menyebabkan suatu penyakit (Post, 1987).

Bakteri adalah mikroorganisme dengan struktur intra-seluler yang sederhana. Sel bakteri terdiri dari sebuah dinding sel yang mengelilingi membran sitoplasma yang berisi sitoplasma tempat inti (Zonneveld, dkk., 1991). Ukuran bakteri sangat kecil, berkisar 0,2 – 20 μm , tergantung pada species dan fase pertumbuhan. Sifat hidup bakteri ada yang bebas, parasitik, saprofitik atau sebagai patogen pada manusia, hewan dan tumbuhan. Bentuk dasar bakteri terdiri dari bulat (coccus), batang dan lengkung. Berdasarkan reaksi sel bakteri terhadap pewarnaan Gram, bakteri dikelompokkan menjadi Gram negatif dan Gram positif (Lehninger, 1995).

Bakteri patogen penyebab penyakit ikan sebagian besar termasuk Gram negatif seperti *Aeromonas sp.*, *Vibrio sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Edwardsiella sp.*, *Flexibacter sp.* (Kamiso & Triyanto, 1991).

Edwardsiella tarda merupakan bakteri Gram negatif aerobik fakultatif tergabung dalam Enterobacteriaceae, dan patogen yang menyebabkan

Enterohaemorrhagic Septicaemic Disease (ESD) pada ikan konsumsi (Meyer & Bullock, 1973). *Edwardsiella tarda* hidup secara alami pada air tawar dan laut, dan dapat menyebabkan gangguan *gastrointestinal* dan *extraintestinal* pada manusia. Selain itu telah dilaporkan penyakit ikan yang disebabkan oleh bakteri ini adalah ikan yang dibudidayakan pada kolam air hangat, tapi penyakit ini juga menyerang salmon yang hidup pada air dingin. Kualitas air yang buruk, suhu air yang tinggi, kotoran dan bahan organik yang terkandung dalam lingkungan budidaya dimungkinkan menjadi pendukung terjadinya serangan bakteri ini dan menjadikannya semakin memperparah tingkat serangan.

Perkembangan infeksi *Edwardsiella tarda* sangat lambat. Pada beberapa kasus, kematian akibat serangan bakteri ini sangat rendah yaitu kurang dari 5%, tetapi pada beberapa kasus menunjukkan gejala penyakit yang tampak nyata dan menimbulkan kematian hingga 50%. Salah satu faktor terjadinya serangan *Edwardsiella tarda* adalah karena ikan mengalami stress, terutama akibat terlalu padat menjelang panen, kondisi kualitas air yang jelek, dan tingginya bahan organik (Hawke & Thune, 1994). Beberapa kasus telah dilaporkan ditemukan menyerang pada beberapa spesies ikan seperti Chinook salmon, channel catfish, mullet dan karper/mas, selain itu juga telah berasosiasi dengan penyakit pada manusia.

Menurut Meyer & Bullock (1973), uji infeksi pada ikan channel catfish (*Ictalurus punctatus*) dengan bakteri *Edwardsiella tarda* dengan dosis injeksi

10^8 CFU/ml (standar Mac Farland), mengalami kematian populasi sebanyak 80% selama 10 hari.

Chen & Lai (1998) melakukan deteksi dengan PCR secara langsung pada ikan yang terinfeksi *Edwardsiella tarda* dan lingkungan dengan mengamplifikasi gen haemolysin. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri *Edwardsiella tarda* dapat dideteksi dengan metode PCR langsung baik dari darah, organ dalam, maupun air.

C. Lingkungan

Lingkungan akan sangat mempengaruhi daya reproduksi, tingkat keganasan dan kemampuan penyebaran penyakit. Kondisi lingkungan yang tidak memenuhi persyaratan bagi kehidupan ikan menjadi pendorong terjadinya stress pada ikan yang merupakan respon fisiologis dalam membangun dan mempertahankan keseimbangan atau adaptasi terhadap perubahan lingkungan (Adams, 1990). Lingkungan yang baik akan meningkatkan daya tahan tubuh ikan, lingkungan yang tidak baik menyebabkan ikan mudah stress dan akan menurunkan ketahanan tubuh ikan terhadap serangan penyakit (Wedemeyer, *et al.*, 1976).

Hal penting yang harus dilakukan adalah penyediaan oksigen terlarut yang cukup, menghindari peningkatan konsentrasi ammonia dan carbon dioksida, mencegah akumulasi bahan organik, serta menghindari fluktuasi suhu yang terlalu besar (Prescod, 1973).

1. Suhu

Suhu merupakan faktor penting yang mempengaruhi perkembangan mikroorganisme. Seluruh mikroorganisme psicrofilik dapat menyesuaikan diri terhadap lingkungan yang ekstrim. Psicrofilik adalah mikroorganisme yang dapat tumbuh pada suhu 0 °C dan tumbuh optimun pada suhu 15 °C dan suhu maksimum sekitar 20 °C (Prescod, 1973).

Ikan mempunyai batas-batas toleransi suhu tertentu untuk mempertahankan pertumbuhan agar tetap normal, nafsu makan dan daya tahan terhadap penyakit (Nabib & Pasaribu, 1989). Perubahan suhu yang mendadak dapat menyebabkan stress pada ikan dan memberi peluang terjangkitnya penyakit. Ikan tropis tumbuh dengan baik pada kisaran suhu 25 – 30 °C (Cholik, dkk. 1991).

2. Oksigen Terlarut

Oksigen terlarut merupakan faktor pembatas penting dalam budidaya ikan. Pada perairan dengan konsentrasi oksigen yang rendah mungkin ikan akan mati, atau minimal menurunkan nafsu makan ikan sehingga pertumbuhannya menjadi terhambat (Cholik, dkk. 1991). Menurut Walters & Plumb (1980), kandungan oksigen terlarut yang rendah merupakan faktor yang paling sering dilaporkan sebagai penyebab infeksi penyakit. Ikan lele dapat hidup dengan kondisi oksigen yang terlarut yang rendah, karena lele mempunyai alat bantu pernafasan (*labirin*) yang berbentuk seperti rerimbunan daun yang dapat mengikat oksigen dari

udara bebas (Mahyuddin, 2008). Kandungan oksigen terlarut dalam air pemeliharaan lele minimum 3 ppm (Khairuman & Amri, 2011).

3. Ammonia (NH₃)

Ammonia yang terdapat di kolam merupakan produk hasil metabolisme ikan dan pembusukan senyawa organik oleh bakteri (Cholik, dkk. 1991). Kenaikan kadar ammonia dapat menyebabkan kerusakan insang dan terganggunya proses respirasi (Nabib & Pasaribu, 1989). Batas pengaruh yang mematikan dapat terjadi apabila konsentrasi NH₃ di perairan berkisar antara 0,1 – 0,3 mg/l (Cholik, dkk. 1991).

4. Derajat keasaman (pH)

Derajat keasaman atau yang lebih populer dengan sebutan pH (*Puisanche of the Hydrogen*) merupakan ukuran konsentrasi ion hydrogen yang menunjukkan suasana asam atau basa suatu perairan. Ukuran nilai pH adalah angka 1 – 14 dan angka 7 merupakan pH netral atau normal. Tingkat keasaman yang dapat ditoleransi lele berkisar 6,5 – 8.

Menurut Boyd (1990) pH yang paling cocok untuk kehidupan ikan berkisar antara 7 – 8. Selanjutnya dikatakan bahwa pH yang lebih kecil dari 6,5 dan lebih besar dari 9 akan menyebabkan pertumbuhan ikan terhambat dan Tingkat keasaman (pH) 4 atau 11 ikan akan mati.

D. Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*)

Ikan lele merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang sudah dibudidayakan secara komersial oleh masyarakat Indonesia terutama di Pulau Jawa. Budidaya lele berkembang pesat dikarenakan dapat dibudidayakan di

lahan dan sumber air yang terbatas dengan padat tebar tinggi, teknologi budidaya relatif mudah dikuasai oleh masyarakat, pemasarannya relatif mudah dan modal usaha yang dibutuhkan relatif rendah (Khairuman & Amri, 2002).

Ikan lele memiliki bentuk dengan potongan badan membulat, kepala pipih kebawah (*depressed*), sedangkan bagian belakang tubuhnya berbentuk pipih kesamping (*compressed*). Kepala bagian atas dan bawah tertutup oleh pelat tulang. Pelat ini membentuk ruangan rongga diatas insang. Mulut berada diujung moncong (*terminale*), dengan dihiasi 4 pasang sungut, ikan lele memiliki alat pernapasan tambahan yang disebut *arborescent organ* yang merupakan membran yang berlipat-lipat penuh dengan kapiler darah. Gonad ikan lele jantan dapat dibedakan dari cirri-cirinya yang memiliki gerigi pada salah satu sisi gonadnya, warna lebih gelap, dan memiliki ukuran gonad lebih kecil daripada betinanya. Gonad ikan lele berwarna lebih kuning, terlihat bintik-bintik telur yang terdapat di dalamnya, dan kedua bagian sisinya mulus tidak bergerigi (Khairuman & Amri, 2002).

Pengembangan usaha budidaya ikan lele semakin meningkat setelah masuknya jenis ikan lele dumbo ke Indonesia pada tahun 1985 yang merupakan hasil perkawinan silang antara lele Afrika dan lele Taiwan. Ikan lele dumbo tergolong omnivora. Di alam ataupun lingkungan budidaya, ia dapat memanfaatkan plankton, cacing, insekta, udang-udang kecil sebagai makanannya.

Menurut Khairuman & Amri (2002), ciri morfologi lele dumbo sama halnya ikan dari jenis lele, memiliki tubuh yang licin, berlendir dan tidak

bersisik. Jika terkena sinar matahari, warna tubuh lele berubah menjadi pucat dan jika terkejut warna tubuhnya otomatis menjadi loreng seperti hitam putih. Mulut lele dumbo relatif lebar yaitu sekitar $\frac{1}{4}$ dari panjang total tubuhnya. Tanda spesifik lainnya adalah adanya kumis di sekitar mulut sebanyak 8 buah yang berfungsi sebagai alat peraba saat bergerak atau mencari makan. Lele dumbo pertama kali didatangkan ke Indonesia oleh sebuah perusahaan swasta pada tahun 1986. Selanjutnya lele jenis ini berkembang dan menyebar, sehingga sampai sekarang disetiap daerah di tanah air dapat dijumpai lele dumbo.

Klasifikasi ikan lele dumbo menurut Hasanudin Saanin dalam Khairuman & Amri (2002) secara lengkap sebagai berikut :

Kingdom	:	Animalia
Subkingdom	:	Metazoa
Filum	:	Chordata
Subfilum	:	Vertebrata
Kelas	:	Pisces
Subkelas	:	Teleostei
Ordo	:	Ostariophysi
Subordo	:	Iluroidea
Famili	:	Clariidae
Genus	:	<i>Clarias</i>
Spesies	:	<i>Clarias gariepinus</i>

E. Pembekuan Ikan dan Pengangkutan Ikan Beku

Ikan termasuk komoditas yang cepat rusak dan bahkan lebih cepat dibandingkan dengan daging hewan lainnya. Kecepatan pembusukan ikan setelah penangkapan dan pemanenan sangat dipengaruhi oleh teknik penangkapan dan pemanenan, kondisi biologis ikan, serta teknik pemanenan dan penyimpanan. Oleh karena itu segera setelah ikan ditangkap atau dipanen harus secepatnya diawetkan dengan pendinginan atau pembekuan (Afriyanto & Liviawaty, 1989).

Menurut Murniyati & Sunarman (2004), pembekuan berarti menyiapkan ikan untuk disimpan dalam suhu rendah (*cold storage*) atau terjadinya suatu proses pengambilan/pemindahan panas dari tubuh ikan ke bahan lain dan pembekuan dapat didefinisikan juga sebagai proses pengambilan panas dari suatu ruangan yang terbatas untuk menurunkan dan mempertahankan suhu ruangan tersebut bersama isinya agar selalu lebih rendah daripada suhu diluar ruangan.

Secara prinsip kelebihan dari pengawetan ikan dengan cara pembekuan menggunakan suhu lebih rendah (jauh dibawah titik beku ikan) adalah sifat – sifat asli ikan tidak mengalami perubahan struktur, rasa dan bau (Murniyati & Sunarman, 2004). Keadaan beku menyebabkan bakteri dan enzim terhambat kegiatannya sehingga daya awet ikan beku lebih besar dibandingkan dengan ikan yang hanya didinginkan. Pada suhu $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ kegiatan bakteri dapat dihentikan tetapi proses – proses enzimatis masih terus berjalan.

Kematian bakteri dalam keadaan beku disebabkan oleh hal-hal sebagai berikut (Murniyati & Sunarman, 2004) :

1. Sebagian besar air di dalam tubuh ikan telah berubah menjadi es dan persediaan cairan menjadi sangat terbatas. Dengan demikian, bakteri akan mengalami kesulitan untuk menyerap makanan, sehingga hidupnya terganggu karena bakteri hanya dapat makanan dalam bentuk es.
2. Cairan di dalam sel bakteri yang ikut membeku mendesak dan memecah dinding sel, sehingga menyebabkan kematian bakteri.
3. Suhu rendah itu sendiri membuat bakteri tidak tahan dan mati.

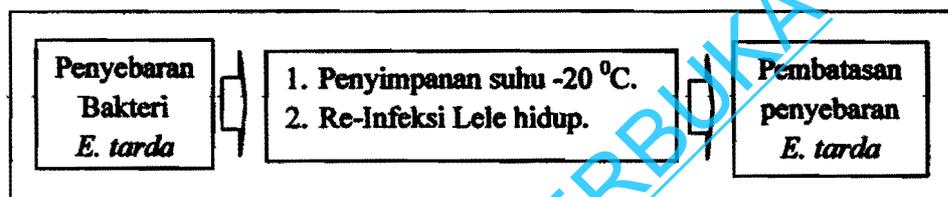
Pengangkutan ikan yang dilakukan melalui jalur kapal laut di Pelabuhan Laut Tanjung Priok menggunakan *container reefer*. *Container reefer* adalah salah satu jenis *refrigeration unit* yang dilengkapi dengan sistem pendingin (*refrigerated*) untuk mempertahankan temperatur komoditi yang ada di dalamnya (Anonim, 2009). Umumnya kisaran temperatur dari *container reefer* ini adalah dari 30 °C s/d -30 °C. Untuk pengangkutan produk perikanan menggunakan *container reefer* dengan suhu - 20 °C.

Jika penanganan ikan kurang baik selama proses pengangkutan dan pemasaran, maka dalam jangka waktu hitungan jam sudah akan tercium bau busuk. Penyebab utama pembusukan ikan segar adalah aktifitas bakteri pada ikan yang mulai aktif sejak ikan mati atau dapat terjadi karena faktor kontaminasi selama rantai penanganan. Untuk memperpanjang umur simpan ikan, dapat dilakukan penyimpanan pada suhu dingin 0 – 4 °C atau pada suhu

beku $< 0^{\circ}\text{C}$ (Afriyanto & Liviawaty, 1989). Umumnya penyimpanan ikan beku pada cold storage dilakukan pada suhu -20°C sampai dengan -30°C .

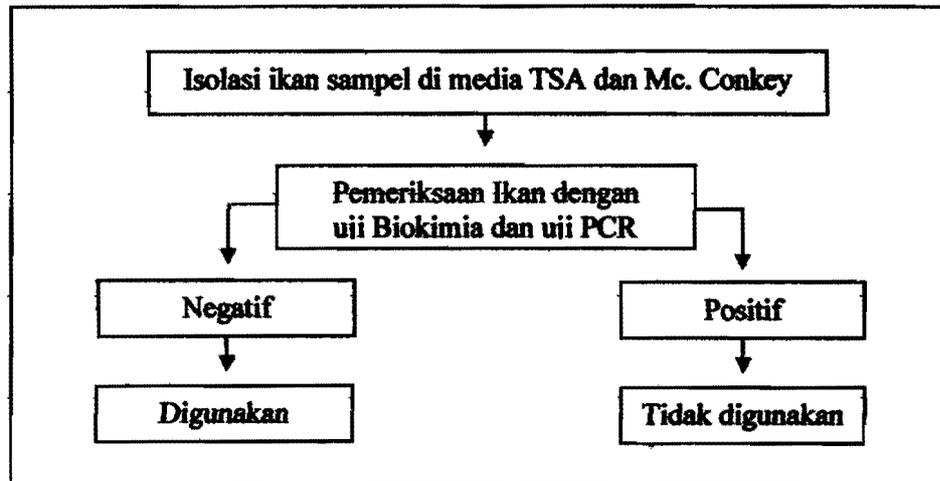
F. Kerangka Berfikir

Kerangka berfikir dari penelitian ini adalah dengan mengetahui viabilitas dan patogenitas dari bakteri *Edwardsiella tarda* maka penyebaran dari bakteri tersebut dapat dibatasi agar tidak mewabah dan merugikan budidaya ikan lele, serta tidak membahayakan keamanan pangan. Diagram kerangka berfikir dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Kerangka berfikir

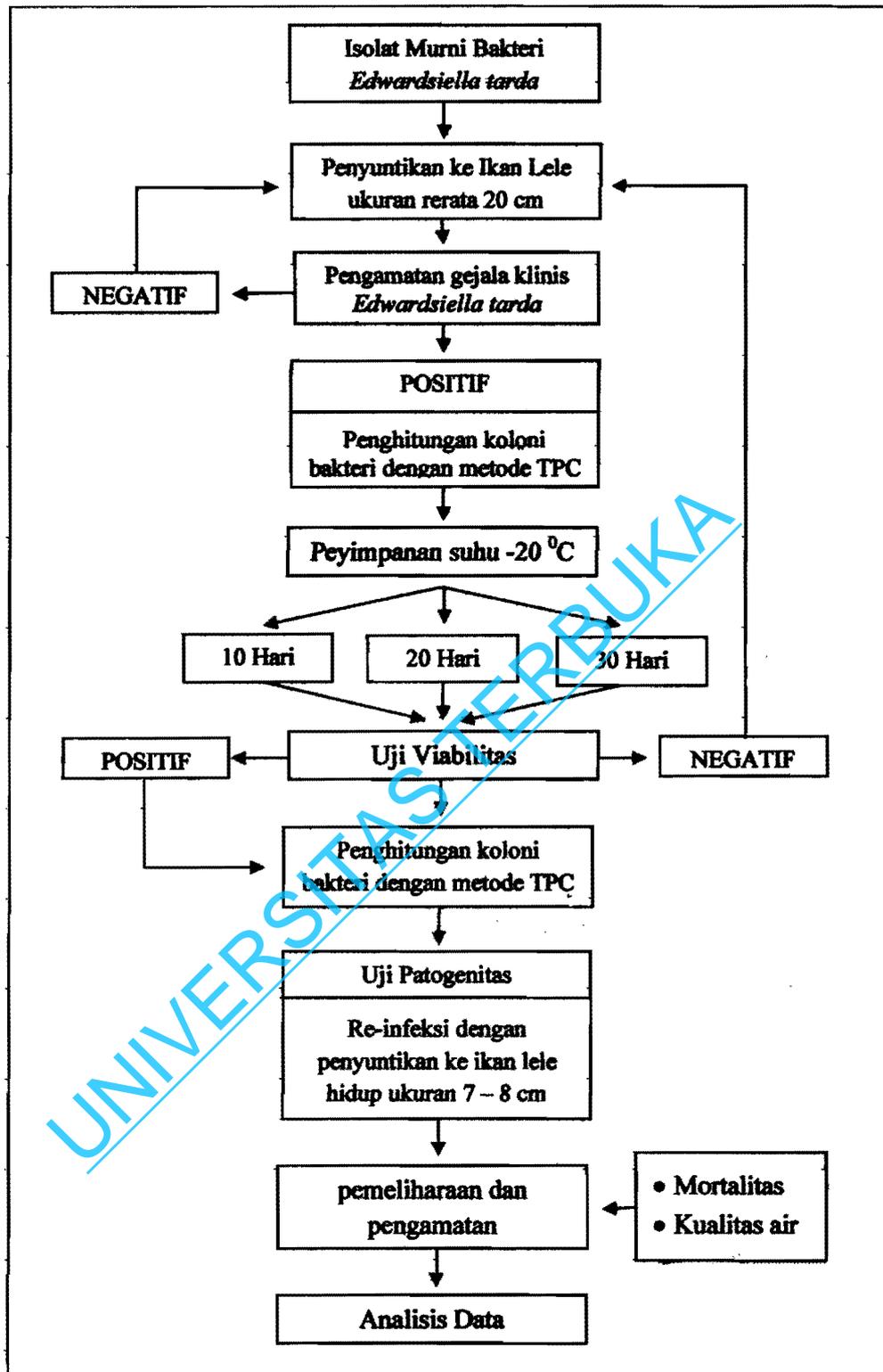
Penelitian ini melalui dua tahapan uji yaitu uji pendahuluan, yang terdiri dari : pemeriksaan ikan uji dan identifikasi bakteri dari isolat. Kemudian dilanjutkan dengan uji utama, yang terdiri dari : penginfeksi bakteri ke ikan uji, penyimpanan ikan uji pada suhu -20°C , uji viabilitas dan uji patogenitas. Tahapan uji tersebut dapat dilihat pada diagram alir langkah kerja Gambar 2.2, 2.3 dan 2.4.



Gambar 2.2 Diagram Alir Langkah Kerja Pemeriksaan Ikan Uji



Gambar 2.3 Diagram Alir Langkah Kerja Identifikasi Bakteri



Gambar 2.4. Diagram Alir Langkah Kerja Uji Utama

G. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah :

- H0** : Lamanya waktu penyimpanan tidak berpengaruh terhadap viabilitas dan patogenitas *Edwardsiella tarda*.
- H1** : Lamanya waktu penyimpanan berpengaruh terhadap viabilitas dan patogenitas *Edwardsiella tarda*.

UNIVERSITAS TERBUKA

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan waktu pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Uji Balai Karantina Ikan Kelas II Tanjung Priok, berlokasi di Jl. Swasembada Timur XIII no.64 Tanjung Priok Jakarta Utara.

Waktu pelaksanaan penelitian mulai dari tahap persiapan, uji pendahuluan sampai dengan tahap uji utama dilakukan sejak tanggal 31 Januari sampai dengan tanggal 28 Maret 2012.

B. Alat dan bahan penelitian

1. Alat

Peralatan yang akan digunakan adalah bak fiberglass berukuran $1 \times 1 \times 0.75 \text{ m}^3$, akuarium ukuran $60 \times 30 \times 30 \text{ cm}^3$, aerator set, jarum suntik 1 ml, nampan, timbangan analitik merk redwag wps 210, dissecting set, cawan petri, tabung reaksi, beaker glass, glass ukur, autoclave merk tomy sx-500, oven merk memmert, *magnetic stirrer* merk ceramag, lampu bunsen, jarum ose, laminary air flow merk esco, incubator merk bio concept, mikroskop merk zeiss, *vortex mixer* merk biosan, *colony counter* merk funke gerber, nampan plastik, plastik pembungkus, penggerus/*tissue grinder*, wadah sampel, mikro pipet merk eppendorf, mikrotube, PCR chamber merk scieplas, PCR cooler block, mesin ampifikasi (*thermal cycler*) merk eppendorf, alat untuk proses elektroforesis, sistem dokumentasi PCR merk UVIDOC, *water quality checker* merk Horiba dan peralatan pendukung lainnya.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : ikan lele dumbo berukuran panjang rerata 24,22 cm (ukuran konsumsi) dan berat rerata 89,94 gram sebanyak 30 ekor, benih lele ukuran 7-8 cm sebanyak 420 ekor, NaCl Fisiologis, air tawar sebagai media pemeliharaan, isolat *Edwardsiella tarda*, bahan untuk kultur bakteri : *Tryptic Soy Agar* (TSA), *Mac Conkey* media, bahan untuk pewarnaan Gram (crystal violet, lugol iodine, alkohol 95 %, safranin), bahan uji karakteristik biokimia yang terdiri dari : H_2O_2 , oksidase tes, kovacks, *Motility Indol Ornithin* (MIO), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Oksidase Fermentase Medium* (OF), *Tryptic Soy Agar* (TSA), MRVP médium, TCBS médium, glukosa, maltosa, sukrosa, laktosa, surbitol, arabinosa, manitol, dan bahan uji pemeriksaan biomolekuler dengan metode PCR yaitu : *Edwardsiella tarda* Forward Primer ETA2-351 (5'-TAG GGA GGA AGG TGT GAA-3') yang telah didesain untuk ampifikasi strain *Edwardsiella tarda* yang diisolasi dari ikan (biotype-2). Sedangkan sebagai reverse primer genus spesifik *Edwardsiella* Edwsp-780r (5'-CTC TAG CTT GCC AGT CTT-3'), *Wizard Genomic DNA, Isolation Kit* (Promega), isopropanol, aquabidest, alkohol 70 %, PCR Core System II (Promega), agarose 1,5 %, loading buffer, TAE buffer, serta bahan habis pakai seperti : sarung tangan, tissue, masker, dan aquades.

C. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yang dilakukan dalam 2 tahap kegiatan yang meliputi uji pendahuluan dan uji utama.

1. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan pada kegiatan uji coba ini dilakukan dalam 2 tahapan kegiatan yaitu pemeriksaan ikan uji dan identifikasi bakteri dari isolat.

a. Pemeriksaan Ikan Uji

- 1) Ikan Lele Dumbo yang digunakan pada uji coba ini diperiksa kesehatannya di laboratorium untuk mendapatkan ikan lele dumbo SPF (*Suspect Pathogen Free*) *Edwardsiella tarda*. Ikan yang diperiksa disampling sebanyak 5% dari keseluruhan ikan yang disiapkan pada bak pemeliharaan untuk kegiatan penelitian ini.
- 2) Prosedur pemeriksaan kesehatan untuk ikan uji adalah sebagai berikut : kultur isolat yang diambil dari organ ginjal, hati dan limpa ikan lele dumbo pada media TSA dan Mac Conkey, apabila setelah di inkubasi selama 24 jam didalam *incubator* dengan suhu 35 °C terdapat koloni yang tumbuh tidak berwarna/transparan pada media Mac Conkey, maka dilanjutkan dengan identifikasi bakteri dengan uji karakteristik biokimia dan uji biomolekuler dengan metode PCR. Menurut Holt, *et al.* (1994), bakteri *Edwardsiella tarda* bila dikultur pada media MacConkey akan membentuk koloni yang tidak berwarna/transparan. Apabila setelah diuji dengan uji karakteristik biokimia dan uji biomolekuler ternyata ikan

tersebut negatif *Edwardsiella tarda*, maka ikan lele tersebut dapat dinyatakan SPF *Edwardsiella tarda* dan dapat dipakai dalam penelitian ini.

b. Identifikasi Bakteri

Kultur murni *Edwardsiella tarda* yang digunakan untuk keperluan penelitian ini dilakukan pengujian atau pengidentifikasian kembali dengan cara mengkultur isolat ke media TSA dan Mac Conkey, kemudian dilanjutkan dengan uji karakteristik biokimia, uji biomolekuler dengan metode PCR dan pewarnaan Gram.

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mempermudah melihat bakteri dengan menggunakan mikroskop, memperjelas ukuran dan bentuk bakteri, serta untuk menentukan pengelompokan spesies bakteri berdasarkan sifat kimia dan fisik dinding sel. Bakteri dibagi ke dalam dua kelompok besar, yaitu Gram positif dan Gram negatif (Anonim, 2007).

Proses identifikasi ini diperlukan untuk memastikan kebenaran bakteri yang dipergunakan dalam penelitian.

2. Uji Utama

Tahapan – tahapan yang dilakukan pada uji utama adalah :

a. Menginfeksi bakteri ke dalam tubuh Ikan

- 1) Ikan lele dumbo dengan ukuran panjang rerata 24,22 cm dan berat 89,94 gram yang akan digunakan untuk penelitian tersebut diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari dalam bak. Sebanyak 10 ekor ikan lele diinfeksi *Edwardsiella tarda* dengan suntikan secara intramuskular sebanyak 0,1 ml dengan dosis 10^8 CFU/ml (berdasarkan standar Mac Farland).

Pengenceran bakteri *Edwardsiella tarda* menggunakan larutan NaCl Fisiologis.

- 2) Ikan lele dumbo yang telah disuntik dipelihara kembali dalam akuarium ukuran 60 x 30 x 30 cm³, yang diisi air setinggi 20 cm atau sekitar 35 liter. Pemeliharaan dilakukan selama 7 hari dengan tujuan agar reaksi bakteri *Edwardsiella tarda* yang diinfeksi pada ikan uji dapat menyebar dengan baik keseluruh tubuh ikan dan ditunjukkan dengan gejala klinis yang mengarah ke bakteri *Edwardsiella tarda*.

b. Penyimpanan Ikan yang telah disuntikkan bakteri

Ikan lele dumbo yang sudah diinfeksi *Edwardsiella tarda* dan telah menunjukkan gejala klinis terserang *Edwardsiella tarda*, pada hari ke tujuh seluruhnya dipanen, kemudian dilakukan kultur bakteri di media TSA. Kultur bakteri yang tumbuh selanjutnya dilakukan uji karakteristik biokimia dan uji biomolekuler untuk memastikan bakteri yang menyerang dan sekaligus penghitungan jumlah bakteri dengan metode *Total Plate Count* (TPC) jika ternyata bakteri yang menyerang adalah bakteri *Edwardsiella tarda*. Selanjutnya ikan lele tersebut dibungkus dengan kantong plastik satu persatu dan diberi label. Pembungkusan dengan cara satu ekor dalam satu lembar kantong plastik ini dilakukan agar memudahkan dalam penyimpanan dan pemeriksaan ikan di laboratorium, selain itu juga untuk menghindari terjadinya kontaminasi *Edwardsiella tarda* atau bakteri lain ditempat penyimpanan/freezer atau diberbagai

tempat sebelum/sesudah dilakukannya proses pembekuan. Ikan uji yang sudah dibungkus tersebut disimpan dalam freezer pada suhu -20°C .

Tahapan penginfeksi bakteri *Edwardsiella tarda* pada ikan lele dumbo ukuran konsumsi dan tahapan penyimpanan ikan lele dumbo yang positif terinfeksi *Edwardsiella tarda* ini diulang sebanyak 3 kali, yang bertujuan untuk mendapatkan ikan lele dumbo positif terinfeksi *Edwardsiella tarda* beku dengan masa penyimpanan 10, 20 dan 30 hari.

c. Uji Viabilitas

Uji viabilitas dilakukan untuk pendeteksian keberadaan bakteri *Edwardsiella tarda* dalam tubuh ikan lele dumbo yang telah dibekukan pada suhu -20°C selama 10, 20 dan 30 hari.

Uji viabilitas ini dilakukan melalui uji biomolekuler dengan metode deteksi *Polymerase Chain Reaction* (PCR), uji karakteristik biokimia dan apabila ternyata masih didapat bakteri *Edwardsiella tarda*, maka dilakukan penghitungan kepadatan koloni bakteri dengan metode *Total Plate Count* (TPC).

1) Metode deteksi PCR

Metode deteksi PCR adalah metode berbasis DNA yang dapat digunakan untuk deteksi cepat dan sensitif dari mikroorganisme pada fase *antemortem* maupun dari jaringan nekropsis. Reaksi berantai polymerase PCR adalah suatu metode enzimatis untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*.

Prinsip kerja PCR adalah memperbanyak DNA mikroorganisme sampai jumlah tertentu dan dapat dilihat jumlahnya dengan menggunakan *genequant*. Teknik ini bekerja dalam siklus yang berulang-ulang sebanyak 20-30 kali setiap siklus yang terdiri dari tiga tahapan reaksi yang berlangsung dalam satu sampai dua menit. *Denaturation* (pemecahan DNA target), *annealing* (penempelan primer kepada untai tunggal), *extention* (pemanjangan primer dengan bantuan enzyme polymerase).

Tahapan yang dilakukan dalam pengujian PCR terdiri dari tiga tahapan utama, yaitu: ekstraksi DNA sampel, amplifikasi DNA sampel dan elektroforesis yang dilanjutkan pembacaan dengan foto.

a). Ekstraksi DNA yang digunakan dalam penelitian ini adalah Wizard® Genomic DNA Purification Kit produk dari Promega dengan instruksi kerja sebagai berikut:

- (1) Pengambilan organ target (*daging*) dengan menggunakan gunting dan pinset steril sebanyak 20 mg, selanjutnya digerus dengan *tissue grinder* atau bisa juga dengan pastel hingga benar-benar halus. Kemudian masukan ke dalam mikrotube steril ukuran 2 ml, tambahkan 600 μ l Nuclease lysis solution.
- (2) Larutan sampel kemudian diinkubasi pada suhu 65 °C selama 30 menit.
- (3) Kemudian ditambahkan 3 μ L RNA solution lalu dibolak balik 3-5 kali lalu inkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37 °C;

- (4) Larutan sampel kemudian didinginkan pada suhu ruang selama kurang lebih 5 menit, dan ditambahkan 200 μ L Protein *Precipitation Solution* lalu vortex dengan kecepatan tinggi selama 20 detik setelah itu didinginkan selama 5 menit pada refrigerator.
- (5) Selanjutnya sampel disentrifuse pada kecepatan 16.000 rpm selama 4 menit.
- (6) Larutan *supernatant* diambil sebanyak 600 μ l secara perlahan dan dipindahkan ke dalam microtube baru 1,5 ml berisi 600 μ l isopropanol lalu dibolak balik
- (7) Kemudian sentrifuse kembali dengan kecepatan 16.000 rpm selama 1 menit
- (8) Selanjutnya buang *supernatant* lalu tambahkan 600 μ l ethanol 70% kemudian disentrifuse dengan kecepatan 16.000 rpm selama 1 menit.
- (9) Larutan *supernatant* dibuang secara hati-hati dan microtube dibiarkan mengering selama 15 menit.
- (10) Kemudian ditambahkan 100 μ l DNA Rehydration Solution dan diinkubasi pada suhu 65 $^{\circ}$ C selama 1 jam atau diamkan selama 24 jam pada suhu ruang atau 4 $^{\circ}$ C
- (11) Selanjutnya DNA disimpan pada suhu 2 – 8 $^{\circ}$ C.

b). Amplifikasi DNA, langkah kerjanya adalah :

- (1) Pekerjaan amplifikasi dilakukan pada PCR chamber dengan menggunakan lampu neon.
- (2) Mikrotube 0,2 ml sesuai jumlah contoh uji disiapkan, diberi label dan diletakkan diatas mikroplate.
- (3) Reagen PCR green master mix, primer *E.tarda*, nucleus free water, DNA template, kontrol positif dan mikrotube diletakkan diatas nampan es di dalam PCR chamber.
- (4) Kemudian membuat campuran reagen untuk dimasukkan kedalam mikrotube 0,2 ml, dengan komposisi seperti pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Komposisi Reagen yang Digunakan dalam Amplifikasi

Bahan / reagen	Volume (μ l)
Green Master Mix 2x	12.5
Nuclease-free Water	6.5
Forward Primer	2
Reverse Primer	2
Total volume campuran reagen	23

- (5) Kemudian ditambahkan template DNA bakteri atau kontrol positif atau kontrol negatif sebanyak 2 μ l sehingga total volume campuran reagen 25 μ l.
- (6) Selanjutnya larutan dicampurkan hingga homogen dengan cara pipeting atau divortex.
- (7) Kemudian tabung campuran reagen disentrifuse selama 1 menit untuk menurunkan larutan pada dasar mikrotube.

- (8) Kemudian mikrotube yang berisi campuran reagen dimasukkan ke dalam mesin PCR (*Thermal cycler*) untuk proses amplifikasi, dan dijalankan dengan program siklus seperti pada tabel 3.2.

Tabel 3.2. Siklus yang Dijalankan pada Proses Amplifikasi

Primer	Forward primer Eta 2-351f (5'-TAG GGA GGA AGG TGT GAA-3') Reverse primer Edwsp-780r (5'- CTC TAG CTT GCC ADT CTT- 3')
Ukuran Amplikon (bp)	216
Denaturasi Awal	94 °C, 2 menit
Denaturasi	94 °C, 1 menit
Annealing	55 °C, 1 menit
Ekstensi	72 °C, 1 menit
Ekstensi Akhir	72 °C, 1 menit
Siklus	30 x (kali)

*) Baird *et al.* (2003) dalam Septiama, dkk. (2008)

- c). Langkah kerja elektroforesis adalah :
- (1) Pembuatan agar gel
 - (a) Agarose ditimbang sebanyak 2% (w/v) kemudian dilarutkan dalam buffer Tris Boric EDTA (1 X TBE) atau Tris Acid EDTA (1 X TAE) sebanyak 25 ml, selanjutnya dipanaskan pada microwave sampai larut dan mendidih.
 - (b) Kemudian agarose dituangkan ke dalam cetakan elektroforesis yang telah dipasang sisir, setelah 20 - 30 menit larutan agarose akan mengeras (membentuk gel).
 - (c) Selanjutnya sisir dari gel agarose diambil sehingga terbentuk sumur, lalu TAE buffer dituangkan ke dalam tangki elektroforesis sampai menutupi permukaan gel

(2) Proses Elektroforesis

- (a) Proses elektroforesis dimulai dengan membuat pengenceran larutan Sybr®green stain dari stok 1 : 100, stok disimpan pada suhu -20 °C. Larutan Sybr®green diambil 0,5 µl dan campurkan dengan 5 µl DNA marker di atas plastik parafilm, kemudian dimasukkan ke dalam sumur /lubang pertama pada agarose secara perlahan dan hati-hati.
- (b) Selanjutnya larutan Sybr®green diambil sebanyak 1 ul, dan dicampurkan dengan 10 µl hasil amplifikasi di atas parafilm hingga homogen. Setiap campuran secara perlahan dan hati-hati, dipipet dan dimasukkan ke dalam sumur/lubang kedua pada agarose dan seterusnya. Alat elektroforesis tersebut kemudian ditutup hingga rapat, selanjutnya mesin/power suplai dihidupkan dengan kekuatan listrik 90 Volt, 500A selama 30 menit.
- (c) Proses selanjutnya setelah mematikan alat adalah mengangkat gel dari tangki elektroforesis kemudian direndam dalam larutan akuades, dicuci sebentar, dan dapat langsung difoto menggunakan alat UVIDOC.

2) Uji Karakteristik Biokimia

Biokimia merupakan ilmu yang mempelajari senyawa-senyawa yang ada dalam sistem hidup, penyusunan senyawa-senyawa tersebut ke dalam sel-sel dan interaksi kimia yang terjadi. Sel-sel pada makhluk hidup tersusun dari biomolekul. Untuk dapat mempertahankan hidup, sel-sel

mengalami metabolisme (reaksi pada sel). Dalam metabolisme sel menyerap energi dari makanan atau nutrisinya, dan energi ini digunakan untuk membentuk biomolekul penyusun sel (Lehninger, 1995).

Lebih lanjut Lehninger (1995) menyatakan bahwa uji karakteristik biokimia bertujuan untuk memahami bagaimana interaksi biomolekul satu dengan lainnya yang membawa sifat-sifat keadaan hidup. Belum pernah dalam pengamatan uji biokimia yang pernah dilakukan terjadi pelanggaran terhadap hukum-hukum fisis yang telah ditemukan sebelumnya, sehingga uji biokimia ini merupakan salah satu metode yang dapat dipakai untuk mengidentifikasi bakteri.

Uji karakteristik biokimia yang umumnya dipakai dalam pengidentifikasian bakteri *Edwardsiella tarda*, yaitu : uji kemampuan menghasilkan gas H₂S, uji oksidatif fermentatif, uji oksidase, uji katalase, uji indole, uji MRVP, uji citrate, uji decarboxylase, uji gelatin hydrolysis dan uji fermentasi karbohidrat (Septiama, dkk., 2008).

3) Penghitungan kepadatan koloni bakteri dengan metode TPC.

Penghitungan koloni bakteri ini dimaksudkan untuk mengetahui jumlah bakteri yang terdapat pada organ daging ikan uji setelah mengalami proses pembekuan, dengan langkah kerja :

- a) Organ daging ikan lele dumbo yang telah terinfeksi *Edwardsiella tarda* dan telah disimpan selama 10, 20 dan 30 hari pada suhu -20 °C diambil sebanyak 1 mg dan dicampur dengan 9 ml NaCl fisiologis

yang kemudian dihomogenkan dengan cara digerus menggunakan alat penggerus/*tissue grinder*.

- b) Setelah campuran homogen diambil larutan beningnya sebanyak 1 ml dan dicampur dengan 9 ml NaCl Fisiologis, seri pengenceran 10^{-2} . Pengenceran ini terus dilakukan sampai didapat seri pengenceran 10^{-8} .
- c) Tiap seri pengenceran mulai dari 10^{-2} sampai 10^{-8} , dikultur di media TSA dengan cara diratakan dipermukaan media agar dengan menggunakan jarum ose steril.
- d) Selanjutnya diinkubasikan di dalam incubator dengan suhu 35°C selama 24 jam, dengan posisi cawan petri terbalik.
- e) Proses penghitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh dilakukan di *coloni counter*. Jumlah koloni yang dihitung yang jumlahnya antara 25 sampai 250 koloni.

d. Uji Patogenitas

Patogenitas *Edwardsiella Tarda* diuji melalui penginfeksi dengan penyuntikan isolat bakteri *Edwardsiella tarda* yang diencerkan dengan dosis 10^8 CFU/ml standar Mac Farland yang berasal dari ikan lele beku dengan masa penyimpanan 10, 20 dan 30 hari. Penyuntikan dilakukan secara *intramuscular* kepada lele hidup ukuran 7-8 cm, dengan langkah kerja yaitu :

- 1). Bakteri *Edwardsiella Tarda* yang berasal dari ikan lele beku yang telah dikultur pada media TSA diencerkan dengan menambahkan NaCl Fisiologis pada sebuah tabung reaksi dan dicocokkan dengan standar kekeruhan Mac farland No.1 (mengindikasikan 10^8 koloni sel bakteri/ml).

- 3). Larutan bakteri tersebut kemudian disuntikkan secara *intramuskular* ke ikan lele ukuran 7-8 cm sebanyak 20 ekor per akuarium dengan dosis 0,05 ml/ekor. Untuk ikan lele kontrol disuntik larutan NaCl fisiologis dengan dosis yang sama.
- 4). Benih lele yang telah disuntik dipelihara di dalam akuarium dan diamati gejala klinis yang ditimbulkan serta dicatat mortalitasnya untuk dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pengamatan gejala penyakit, mortalitas dan kualitas air dilakukan setiap hari selama 15 hari.

D. Analisis data

1. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan Acak Lengkap (RAL), karena pada penelitian ini media atau bahan percobaan seragam atau dapat dianggap seragam dan hanya ada satu sumber keragaman yaitu perlakuan (Kusriningrum, 2010).

model matematikanya yaitu $Y_{ij} = \mu + t_i + \varepsilon_{ij}$

dimana :

Y_{ij} = Nilai pengamatan pada perlakuan ke-i, ulangan ke-j

μ = Nilai tengah umum

t_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} = Pengaruh acak (kesalahan percobaan) pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

t = Banyaknya perlakuan

n = Banyaknya ulangan

Perlakuan dalam penelitian ini adalah lamanya masa penyimpanan pada suhu -20°C , yaitu :

P1 = Masa penyimpanan selama 10 hari.

P2 = Masa penyimpanan selama 20 hari

P3 = Masa penyimpanan selama 30 hari.

Ulangan yang diperlukan dalam penelitian ini ditentukan dengan rumus $t(n-1) \geq 15$, dimana t = banyaknya perlakuan dan n = banyaknya ulangan.

Karena perlakuan yang dipakai = 3, maka ulangan yang dibutuhkan adalah :

$$3(n-1) \geq 15$$

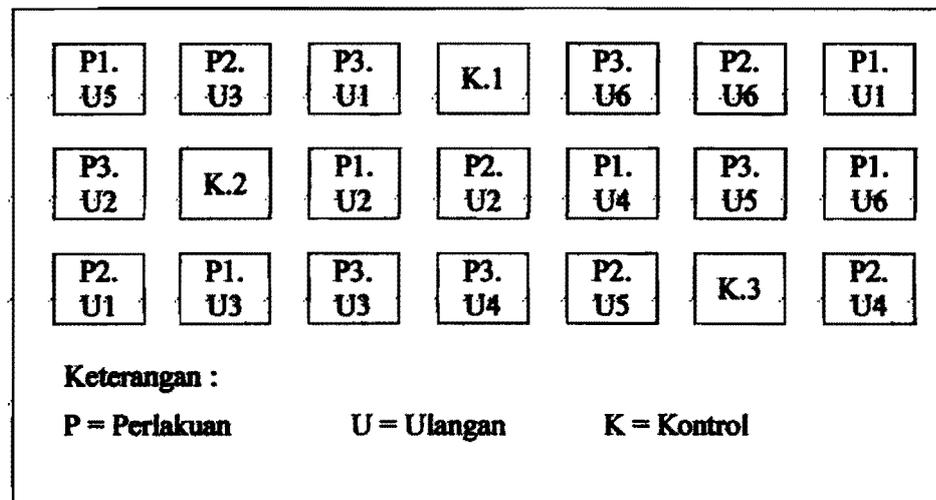
$$3n-3 \geq 15$$

$$3n = 18$$

$$n = 18/3 = 6$$

sehingga didapat ulangan minimal untuk 3 perlakuan sebanyak 6 ulangan dan ditambah 1 akuarium kontrol untuk tiap perlakuan (Kusriningrum, 2010).

Wadah akuarium perlakuan beserta kontrol diacak sesuai dengan bagan penelitian pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Bagan Penelitian

Data yang diperoleh diolah dengan analisis statistik menurut pola Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan analisis ragam (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh perlakuan pada masing-masing parameter yang diamati.

Perlakuan berpengaruh nyata apabila F hitung lebih besar dari F tabel (5 %), apabila F hitung lebih besar dari F tabel (1 %) perlakuan berpengaruh sangat nyata, dan apabila F hitung lebih kecil dari F tabel (5 %) perlakuan tidak nyata. (Harafiah, K.I. 1991) Untuk mengetahui beda nyata antar perlakuan, dilakukan analisis DMRT (*Duncan Multiple Range Test*).

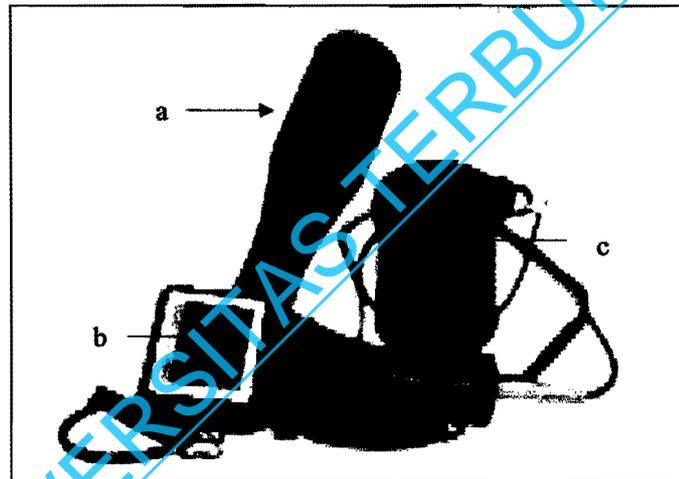
2. Parameter Utama yang Diamati

Parameter utama yang dicatat dalam penelitian ini adalah :

- a. Mortalitas harian ikan uji setiap hari selama 15 hari.
- b. Temperatur air, Oksigen (O_2), Amoniak (NH_3) dan Tingkat Keasaman (pH) terlarut pada pagi dan sore hari setiap hari selama 15 hari.

Pengecekan kualitas air menggunakan *multi water quality checker U-50 series* buatan Horiba (Gambar 3.2), dengan langkah kerja yaitu :

- 1) Sebelum menggunakan *multi water quality checker U-50 series*, bagian *sensor probe* dibilas terlebih dahulu dengan aquades.
- 2) Hidupkan power *multi water quality checker U-50 series* dengan menekan tombol start, kemudian masukkan *sensor probe* kedalam akuarium.
- 3) Selanjutnya didiamkan sampai angka yang berada di *control unit* berhenti yang menandakan nilai pada parameter kualitas air tertentu.



Keterangan :

a. Sensor probe b. Control unit c. Tutup sensor probe

Gambar 3.2. Alat Penguji Parameter Kualitas Air
(*Multi Water Quality Checker*)

BAB IV. TEMUAN DAN PEMBAHASAN

A. Penelitian Pendahuluan

1. Pemeriksaan Ikan Lele Dumbo

Ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) berukuran rerata 24,22 cm dan rerata berat 89,94 gram yang digunakan untuk penelitian ini berasal dari kelompok tani Jumbo Lestari yang terletak di Desa Babakan Ciseeng, Kecamatan Ciseeng, Kabupaten Bogor.

Sebelum dipergunakan sebagai bahan uji, ikan tersebut diberi perlakuan dan dipelihara selama 7 hari, agar ikan dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Proses ini dimaksudkan agar ikan akan digunakan dalam penelitian ini benar-benar sehat, dalam kondisi yang baik dan tidak stres.

Setelah ikan diadaptasi selama 7 hari dan telah dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru kemudian dilakukan pemeriksaan kesehatannya untuk memastikan ikan benar-benar bebas dari bakteri *Edwardsiella tarda*. Ikan diperiksa secara sampling sebanyak 10 % dari total jumlah ikan. Pengujian dilakukan di Laboratorium Uji Balai Karantina Ikan Kelas II Jakarta II, Jl. Swasembada Timur XIII No. 64 Tanjung Priok Jakarta Utara.

Proses pengujian ikan lele dumbo dimulai dari mengisolasi dan mengkultur isolat bakteri yang diambil dari organ ginjal, hati dan usus ikan ke media TSA agar dan Mc Conkey yang kemudian diinkubasi di inkubator dengan suhu 35 °C selama 24 jam (El-Yazeed & Ibrahim, 2009). Menurut Hawke (1979) dalam Austin & Austin (1987), morfologi koloni *Edwardsiella*

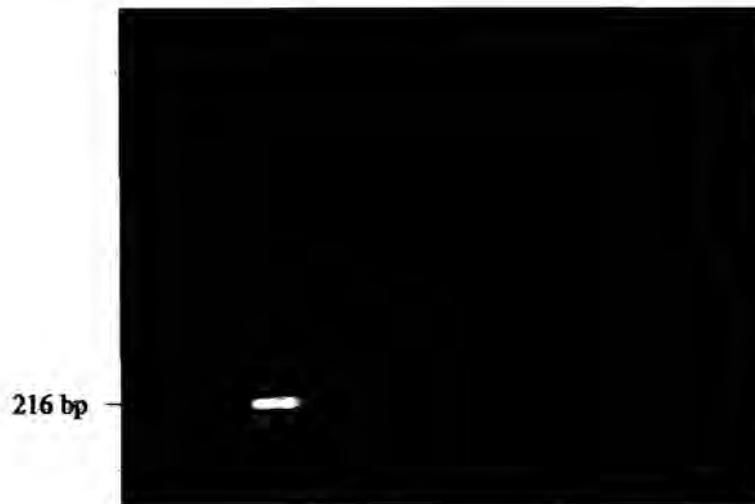
tarda adalah : permukaan rata, berbentuk bundar, diameter 2 mm, sedikit cembung, tepi rata dan transparan.

Koloni bakteri yang mendekati morfologi koloni *Edwardsiella tarda* diambil untuk dilakukan pemurnian di media yang sama dan juga diinkubasi di inkubator dengan suhu 35 °C selama 24 jam. Morfologi koloni bakteri *Edwardsiella tarda* dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Morfologi Koloni *Edwardsiella tarda* pada Media TSA

Hasil pemurnian bakteri *suspect* kemudian diuji dengan uji karakteristik biokimia dan uji biomolekuler dengan metode PCR. Hasil dari uji biokimia dan uji PCR ternyata ikan lele tersebut bebas dari bakteri *Edwardsiella tarda* dan dapat dipergunakan untuk penelitian. Hasil deteksi dengan uji PCR dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Keterangan :

M	: DNA Marker	U1	: Isolat Ulangan 1
P	: Kontrol Positif	U2	: Isolat Ulangan 2
N	: Kontrol Negatif	U3	: Isolat Ulangan 3
		U4	: Isolat Ulangan 4

Gambar 4.2. Hasil Uji PCR Ikan Lele Dumbo

2. Identifikasi Bakteri dari Isolat

Bakteri *Edwardsiella tarda* yang akan dipergunakan dalam penelitian ini berupa isolat awetan yang didapat dari Balai Uji Standar Karantina Ikan, Cilangkap Jakarta Timur. Sebelum dipergunakan isolat bakteri ini diuji terlebih dahulu untuk memastikan jenisnya.

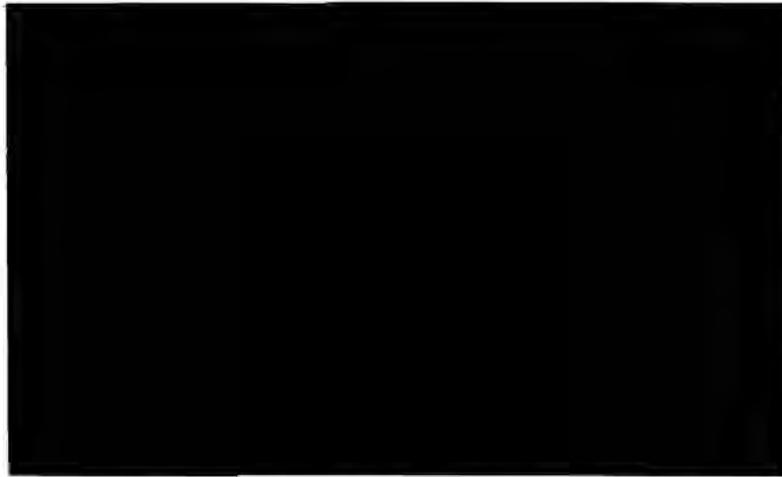
Pengujian dilakukan dengan cara mengkultur kembali isolat *Edwardsiella tarda* tersebut ke media TSA dan Mac Conkey dan diinkubasikan ke dalam inkubator dengan suhu 35 °C selama 24 jam. Setelah masa waktu 24 jam tampak tumbuh koloni dengan diameter 1-2 mm, berbentuk bundar, dan tidak berwarna/transparan, kemudian dilakukan pengujian karakteristik biokimia. Hasil pembacaan uji karakteristik biokimia dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel.4.1. Hasil Pembacaan Uji Karakteristik Biokimia Isolat *Edwardsiella tarda*.

Karakter Uji Biokimia	Hasil		
	Isolat	Faddin (1980)	Austin & Austin (2007)
Produksi H ₂ S	+	+	+
Oksidatif/ Fermentatif (OF)	F	F	F
Oksidase	-	-	-
Katalase	+	+	+
Motility	+	+	+
Indol	+	+	+
Methyl Red	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-
Simmons citrate	-	-	-
Arginin dihydrolase	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+
Gelatin hydrolysis	-	-	-
Urea hydrolysis	*)	-	-
Glukosa	+	+	+
Laktosa	*)	-	-
Sukrosa	*)	-	-
Maltosa	+	+	+
Manitol	-	-	-
Salicin	*)	-	-
Sorbitol	*)	-	-
Arabinosa	-	-	-
Raffinosa	*)	-	-
Rhamnosa	*)	-	-
Trehalosa	*)	+	+
Xylosa	*)	-	-

Keterangan : *) = Tidak dilakukan

Selanjutnya dilakukan pewarnaan Gram untuk memastikan sifat Gram bakteri dari isolat. Hasil pewarnaan Gram dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3. Pewarnaan Gram Isolat *Edwardsiella tarda* (Pembesaran 1000 Kali)

Hasil isolasi bakteri *Edwardsiella tarda* yang berasal dari isolat kemudian dilakukan uji biomolekuler dengan metode PCR. Hasil uji PCR dapat dilihat pada gambar 4.4.



Keterangan :

M	: DNA Marker	U	: Isolasi Ulangan 1
P	: Kontrol Positif	U2	: Isolasi Ulangan 2
N	: Kontrol Negatif	U3	: Isolasi Ulangan 3

Gambar 4.4. Hasil Uji PCR isolat *Edwardsiella tarda*

Hasil pembacaan uji karakteristik biokimia isolat sama dengan hasil pembacaan uji karakteristik biokimia yang dilakukan oleh Faddin (1980) dan Austin & Austin (2007) dalam Anonim (2007). Menurut Lehninger (1995), belum pernah dalam pengamatan uji biokimia yang pernah dilakukan terjadi pelanggaran terhadap hukum-hukum fisis yang telah ditemukan sebelumnya. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan warna merah yang berarti bakteri tersebut adalah bakteri Gram negatif dan berbentuk batang pendek, hal ini sama seperti yang diungkapkan oleh Plumb (1993) bahwa karakteristik *Edwardsiella tarda* adalah bakteri Gram negatif yang berbentuk batang pendek. Hasil uji biomolekuler dengan PCR, pita DNA yang timbul sejajar dengan pita DNA pada kontrol positif. Berdasarkan hasil dari semua uji ini menunjuk bahwa isolat yang diuji memang benar merupakan bakteri *Edwardsiella tarda*, sehingga dapat dipergunakan dalam penelitian ini.

B. Penginfeksian Ikan Lele Dumbo

1. Penginfeksian *Edwardsiella tarda* ke Ikan Lele Dumbo

Penyuntikan bakteri *Edwardsiella tarda* kepada ikan lele dumbo dengan ukuran rata-rata 24,22 cm dan berat 89,94 grm dilakukan secara *intramuskular* sebanyak 0,1 ml dengan dosis 10^3 CFU/ml standar McFarland terhadap ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) dengan panjang rata-rata 24,22 cm dan berat rata-rata 89,94 gram. Ukuran rata-rata panjang dan berat ikan lele dumbo yang dipergunakan pada penyuntikan pertama, kedua dan ketiga dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Rata-rata Panjang dan Berat Ikan Lele Dumbo yang Diinfeksi.

Tahapan Penyuntikan	Panjang	Berat
Pertama	23,65 cm	88,80 gram
Kedua	24,19 cm	90,93 gram
Ketiga	24,83 cm	90,08 gram
Rata-rata	24,42 cm	89,94 gram

Pemakaian dosis suspensi bakteri *Edwardsiella tarda* dengan dosis 10^8 CFU/ml, berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh El-Yazeed & Ibrahim (2009) yang melakukan penginfeksian bakteri *Edwardsiella tarda* pada ikan catfish (*Clarias gariepinus*) dengan berat 120 dan nila (*Tilapia nilotica*) dengan berat 60 gram. Menurut Sahoo, *et al.* (2000) dalam El-Yazeed & Ibrahim (2009), penentuan dosis 10^8 CFU/ml berdasarkan standar kekeruhan McFarland tabung nomor 1, yang dibuat dengan cara mengencerkan isolat bakteri *Edwardsiella tarda* dengan menggunakan garam fisiologis sampai dengan didapatkan kekeruhan yang sesuai dengan tabung standar Mac Farland 10^8 CFU/ml.

Penginfeksian dengan dosis 10^8 CFU/ml ini juga pernah dilakukan oleh Balai Uji Standar Karantina Ikan pada ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*) ukuran 15 – 20 cm (Rizky, dkk., 2008).

Setelah penyuntikan, ikan lele dikembalikan ke dalam akuarium untuk diamati. Pada hari ke tiga setelah penyuntikan, terlihat ikan cenderung diam menggantung, warna tubuh ikan lele lebih pucat, berenangannya tidak beraturan, sirip punggung dan sirip perut pecah-pecah dan adanya luka borok terutama di sekitar punggung tempat penyuntikan (Gambar 4.5). Gejala klinis ini sama

dengan gejala klinis ikan yang terserang bakteri *Edwardsiella tarda*, yang diungkapkan oleh Septiama, dkk. (2008).

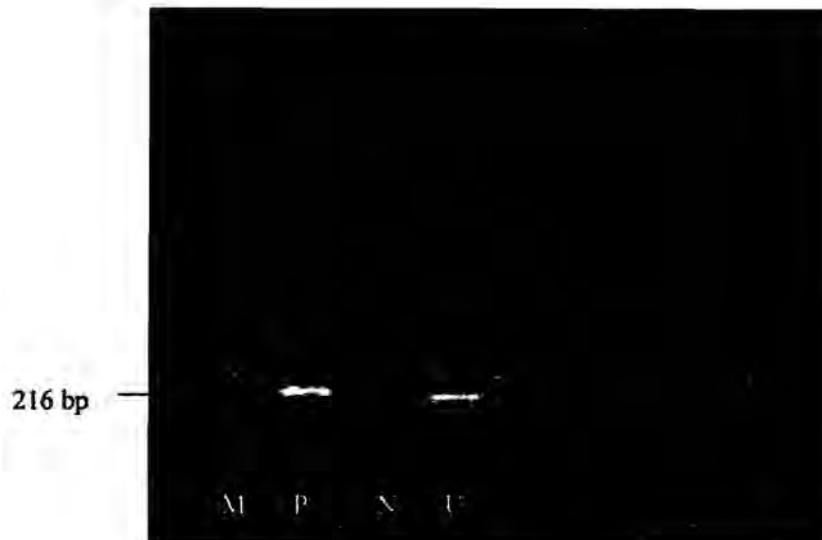


Keterangan : a. Sirip punggung pecah-pecah b. Luka borok

Gambar 4.5. Gejala Klinis Ikan Lele Dumbo yang Terserang *Edwardsiella tarda*

Untuk memastikan bahwa ikan lele dumbo yang telah menunjukkan gejala klinis *Edwardsiella tarda* positif terserang bakteri *Edwardsiella tarda* sebelum dibekukan pada suhu -20°C , dilakukan pemeriksaan uji biomolekuler dengan metode PCR dan uji karakteristik biokimia.

Setelah dilakukan pemeriksaan uji biomolekuler dengan metode PCR terhadap sampel organ daging yang luka dan pengujian karakteristik biokimia, terbukti bahwa pada luka yang timbul di tubuh ikan lele dumbo tersebut positif terdapat bakteri *Edwardsiella tarda*. Hasil uji deteksi dengan PCR dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Keterangan :

M : DNA Marker N : Kontrol Negatif
P : Kontrol Positif U : Isolat Ikan Lele

Gambar 4.6. Hasil Uji PCR Ikan Lele Dumbo yang Diinfeksi *Edwardsiella tarda*

2. Penghitungan Jumlah Koloni Bakteri *Edwardsiella tarda*

Organ daging dari luka yang ditimbulkan oleh bakteri *Edwardsiella tarda* pada ikan lele dumbo diambil sebanyak 1 mg dan diencerkan dengan 9 ml NaCl fisiologis kemudian digerus dan setelah homogen larutan diambil sebanyak 1 ml serta ditambahkan 9 ml NaCl fisiologis untuk seri pengenceran 10^{-2} . Pengenceran ini dilakukan terus menerus sampai dengan didapat seri pengenceran 10^{-8} . Selanjutnya larutan bakteri *Edwardsiella tarda* seri pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-8} dikultur di media TSA selama 36 jam di dalam inkubator untuk kemudian dihitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh dengan *coloni counter*.

Hasil penghitungan jumlah koloni bakteri *Edwardsiella tarda* pada ikan lele dumbo dengan metode *total plate count* sebelum disimpan pada suhu -20°C dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3. Jumlah Total Koloni Bakteri *Edwardsiella tarda* (CFU/g) Dalam Organ Daging Ikan Lele Dumbo Sebelum Disimpan pada Suhu -20°C

Ulangan	Perlakuan		
	1	2	3
1	$18,0 \times 10^6$	$17,2 \times 10^6$	$16,7 \times 10^6$
2	$17,8 \times 10^6$	$16,7 \times 10^6$	$17,4 \times 10^6$
3	$14,8 \times 10^6$	$18,4 \times 10^6$	$16,8 \times 10^6$
Rata-rata	$16,8 \times 10^6$	$17,4 \times 10^6$	$16,9 \times 10^6$

3. Penyimpanan pada Suhu -20°C .

Ikan lele yang hidup sampai dengan hari ke tujuh sejak penyuntikan kemudian dipanen dan dimasukkan ke dalam ember plastik yang telah diisi dengan es batu. Setelah ikan tidak bergerak lagi/mati, ikan lele tersebut dimasukkan ke dalam kantong plastik satu persatu, diberi label dan dibekukan dalam freezer -20°C selama 10, 20 dan 30 hari. Pembungkusan dengan menggunakan kantong plastik, yang diisi sebanyak satu ekor ikan lele tiap kantongnya ini dengan maksud untuk menghindari kontaminasi silang antar ikan lele maupun dengan freezer itu sendiri.

Perlakuan di atas diulang sebanyak dua kali lagi sesuai jadwal penelitian, yang bertujuan untuk mendapatkan ikan lele dumbo yang positif terserang bakteri *Edwardsiella tarda* beku yang disimpan pada suhu -20°C dengan masa penyimpanan 10, 20 dan 30 hari.

C. Viabilitas

Viabilitas adalah kemampuan bertahan hidup bakteri *Edwardsiella tarda* dalam tubuh ikan lele dumbo yang telah dibekukan pada suhu -20°C selama 10 hari, 20 hari dan 30 hari.

Brady & Vinitnantharat (1990), menyatakan bahwa bakteri *Edwardsiella tarda* masih dapat bertahan hidup pada tubuh ikan channel catfish (*Ictalurus punctatus*) utuh yang disimpan pada suhu -20°C selama lebih dari 20 hari. Setyaningsih, dkk. (2008). menyatakan bahwa bakteri *Edwardsiella tarda* masih dapat bertahan hidup khususnya pada organ daging dan ginjal ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) utuh yang disimpan pada suhu -20°C sampai dengan hari ke 32 dengan kecenderungan semakin lama waktu penyimpanan pada suhu -20°C , jumlah total bakteri setelah dihitung dengan metode *total plate count* semakin menurun seiring dengan lamanya waktu penyimpanan.

Hasil uji biomolekuler dengan metode PCR terhadap organ daging ikan lele dumbo yang dibekukan pada suhu -20°C dengan masa penyimpanan selama 10 hari, 20 hari dan 30 hari menunjukkan hasil yang positif *Edwardsiella tarda* (Gambar 4.7).

Hasil uji karakteristik biokimia yang dilakukan terhadap organ daging ikan lele dumbo yang dibekukan pada suhu -20°C dengan masa penyimpanan selama 10 hari, 20 hari dan 30, menunjukkan hasil yang sama dengan hasil uji biokimia *Edwardsiella tarda* yang pernah dilakukan oleh Faddin (1990) dan Austin & Austin (2007) dalam Anonim (2007). Kesimpulan yang didapat bahwa ternyata bakteri *Edwardsiella tarda* masih mampu bertahan hidup

dalam organ daging ikan lele dumbo yang telah dibekukan pada suhu -20°C dengan masa penyimpanan selama 10 hari, 20 hari dan 30.



Keterangan :

M : DNA Marker	P1 : Perlakuan 1
P : Kontrol Positif	P2 : Perlakuan 2
N : Kontrol Negatif	P3 : Perlakuan 3

Gambar 4.7. Hasil Uji PCR Terhadap Ikan Lele Dumbo yang Disimpan Selama 10, 20 dan 30 Hari.

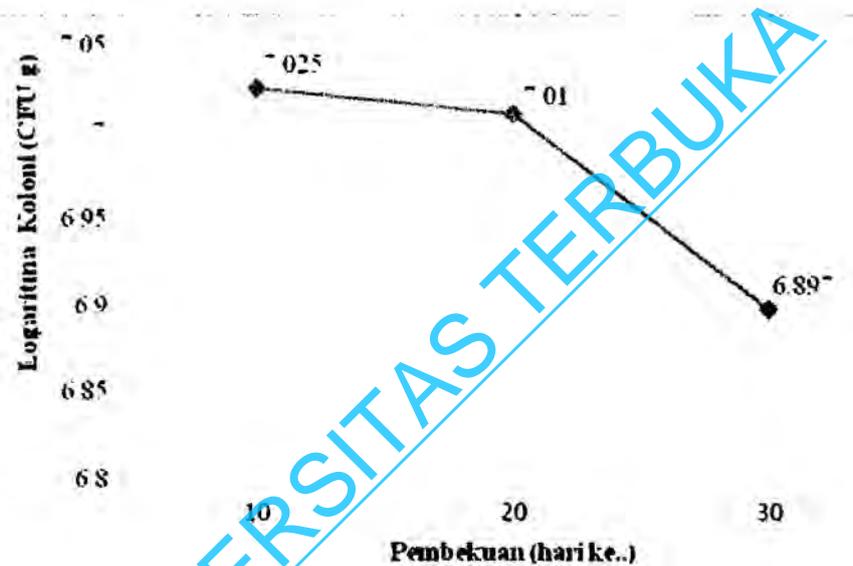
Astawan (2008) dalam Setyaningsih, dkk. (2008), menyatakan bahwa penyimpanan pada suhu rendah baik pendinginan maupun pembekuan tidak membunuh semua mikroorganisme, tetapi hanya menghambat pertumbuhannya, semakin menguatkan bahwa bakteri *Edwardsiella tarda* masih dapat bertahan hidup pada tubuh ikan lele dumbo beku yang disimpan pada suhu -20°C dengan masa penyimpanan sampai dengan 30 hari.

Selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah bakteri *Edwardsiella tarda* yang terdapat pada masing-masing perlakuan ikan uji dengan menggunakan

metode penghitungan dengan *Total Plate Count* (TPC). Hasil penghitungan dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan Gambar 4.8.

Tabel 4.4. Jumlah Total Koloni Bakteri *Edwardsiella tarda* (CFU/g) Dalam Organ Daging Ikan Lele Dumbo yang Disimpan pada Suhu -20°C Selama Masa Penyimpanan 10, 20 dan 30 hari.

Ulangan	Penyimpanan pada suhu -20°C pada hari ke		
	10	20	30
1	$10,6 \times 10^6$	$11,3 \times 10^6$	$7,3 \times 10^6$
2	$10,8 \times 10^6$	$9,7 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$
3	$10,4 \times 10^6$	$9,8 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6$
Rata-rata	$10,6 \times 10^6$	$10,2 \times 10^6$	$7,9 \times 10^6$



Gambar 4.8. Grafik Logaritma Koloni Bakteri *Edwardsiella tarda* (CFU/g) pada Ikan Lele Beku Setelah Penyimpanan Suhu -20°C Selama 10,20 dan 30 Hari

Jumlah total bakteri *Edwardsiella tarda* dalam CFU/g setelah di logaritma, seperti terlihat pada Gambar 4.8 di atas menunjukkan bahwa terjadinya penurunan jumlah seiring dengan lamanya waktu penyimpanan. Terjadinya penurunan jumlah bakteri seiring dengan lamanya penyimpanan

pada suhu -20°C , membuktikan bahwa pertumbuhan dan perkembangbiakan sel bakteri *Edwardsiella tarda* terhambat seiring dengan semakin lamanya penyimpanan pada suhu -20°C .

Hasil analisis ragam dengan menggunakan tingkat kepercayaan pengujian sebesar 95% didapati nilai F hitung sebesar 11,29, F tabel 5% sebesar 5,14 dan F tabel 1% sebesar 10,92. Jika dibandingkan antara F hitung dengan F Tabel, maka didapati F hitung $>$ F tabel 1% artinya perlakuan penyimpanan pada suhu -20°C selama 10, 20 dan 30 hari memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap viabilitas bakteri *Edwardsiella tarda*. Hasil analisis ragam dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5. Analisis Ragam (Anova) Pengaruh Perlakuan Terhadap Jumlah Total Koloni Bakteri *Edwardsiella tarda*.

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F-Hitung	F- Tabel	
					5 %	1 %
Perlakuan	2	0,0293	0,0146	11,2929	5,14	10,92
Galat	6	0,0077	0,0013			
Total	8					

Untuk mengetahui beda nyata antar perlakuan, selanjutnya dilakukan analisis DMRT (*Duncan Multiple Range Test*). Hasil analisis Duncan menunjukkan hasil :

$$R_p = q_{\alpha} \times S_y$$

$$S_y = \sqrt{\frac{2 \times KTG}{r}} = \sqrt{\frac{2 \times 0,0013}{3}} = 0,0294$$

P	2	3
$q_{\alpha=0,05}(p,15)$	3,46	3,58
S_y	0,0294	0,0294
R_p	0,1017	0,1052

Hasil uji berganda Duncan

Perlakuan (Penyimpanan pada suhu -20°C)	Rataan
P1 (10 hari)	7,0253 a
P2 (20 hari)	7,0104 a
P3 (30 hari)	6,8975 b

dari hasil perhitungan diatas terlihat bahwa penyimpanan pada suhu -20°C dengan masa penyimpanan 10 hari (P1) memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata dibandingkan dengan masa penyimpanan 20 hari (P2), tetapi berbeda nyata dengan masa penyimpanan 30 hari (P3), demikian juga perbandingan antara masa penyimpanan 20 hari (P2) terhadap masa penyimpanan 30 hari (P3) memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap jumlah koloni bakteri *Edwardsiella tarda* (CFU/g).

D. Patogenitas

Patogenitas adalah kemampuan organisme untuk menyebabkan suatu penyakit (Lehninger, 1995). Uji patogenitas bakteri *Edwardsiella tarda* yang berada dalam tubuh ikan lele dumbo beku yang disimpan dalam suhu -20°C selama 10, 20 dan 30 hari, dilakukan dengan penginfeksi kembali bakteri *Edwardsiella tarda* yang didapat dari tubuh ikan lele dumbo beku ke benih ikan lele dumbo hidup yang berukuran 7-8 cm. Pengecekan tingkat patogenitas bakteri *Edwardsiella tarda* yang berada dalam tubuh ikan lele dumbo beku yang disimpan dalam suhu -20°C selama 10, 20 dan 30 hari dilakukan dengan menghitung tingkat mortalitas ikan lele dumbo ukuran 7-8 cm yang telah diinfeksi bakteri *Edwardsiella tarda* yang dipelihara selama 15 hari.

Ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang dipergunakan sebagai bahan penelitian didapat juga dari kelompok tani Jumbo Lestari yang terletak di Desa Babakan Ciseeng, Kecamatan Ciseeng, Kabupaten Bogor.

Sebelum dipergunakan sebagai bahan uji, ikan lele dumbo hidup ukuran 7-8 cm tersebut diberi perlakuan dan dipelihara selama 7 hari, agar ikan dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Proses ini dimaksudkan agar ikan yang akan digunakan dalam penelitian ini benar-benar dalam kondisi sehat dan tidak stres.

Setelah ikan benar-benar telah dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru kemudian dilakukan pemeriksaan kesehatannya, melalui uji biomolekuler dengan metode PCR dan uji karakteristik biokimia untuk memastikan ikan benar-benar bebas dari bakteri *Edwardsiella tarda*. Pemeriksaan kesehatan ikan lele dumbo ukuran 7-8 cm tersebut dilakukan dengan metode sampling sebanyak 5% dari total jumlah ikan. Pemeriksaan kesehatan ikan lele ukuran 7-8 cm ini dilakukan di laboratorium Balai Karantina Ikan Kelas II Tanjung Priok.

Kultur bakteri *Edwardsiella tarda* diisolasi dari luka yang ditimbulkan akibat serangan bakteri *Edwardsiella tarda*. Menurut Stevenson (1988) dalam Setyaningsih, dkk. (2008) bakteri yang diisolasi dari ikan yang sakit terutama pada bagian yang terserang, pada umumnya memiliki tingkat virulensi yang lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri yang diisolasi dari lingkungan perairan.

Bakteri *Edwardsiella tarda* yang berasal dari ikan lele beku yang telah dikultur pada media TSA diencerkan dengan menambahkan larutan NaCl Fisiologis pada sebuah tabung reaksi dan dicocokkan dengan standar kekeruhan Mac Farland No.1 yang mengindikasikan 10^8 koloni sel bakteri/ml.

Larutan tersebut kemudian disuntikkan secara *intramuskular* ke ikan lele ukuran 7-8 cm sebanyak 20 ekor per akuarium dengan dosis 0,05 ml/ekor sebanyak 20 ekor ikan lele dumbo per akuarium. Ikan lele dumbo untuk kontrol juga disuntik dengan larutan NaCl fisiologis sebanyak 0,05 ml/ekor.

Ikan lele dumbo ukuran 7-8 cm yang telah disuntik dipelihara dalam akuarium dan diamati gejala klinis yang ditimbulkan serta dicatat mortalitasnya. Selama masa pemeliharaan ikan lele tersebut diberi pakan komersil setiap sore hari secara *ad libitum*. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa mortalitas ikan lele tersebut disebabkan oleh serangan bakteri *Edwardsiella tarda* bukan karena kekurangan makan.

Pada hari ke dua pasca penyuntikan, ikan lele mulai menunjukkan gejala klinis, yaitu : warna tubuh yang memucat, gerakan yang lemah, cenderung menggantung di akuarium, sirip ekor tampak lebih merah dan sebagian terjadi pendarahan, serta terdapat luka di tubuh terutama di area penyuntikan.

Menurut Afrianto & Liviawaty (1992), serangan *Edwardsiella tarda* pada ikan dalam tahap infeksi ringan hanya menampakkan luka-luka kecil, pada tingkat selanjutnya terjadi luka bernanah yang berkembang dalam daging dan otot. Pada kasus akut luka bernanah secara cepat bertambah besar yang kemudian menimbulkan borok yang berbentuk cembung dan apabila luka

digores akan tercium bau busuk. Secara jelas gejala klinis yang tampak saat pengamatan tersaji dalam Tabel 4.6 dan Gambar 4.9.

Tabel 4.6. Gejala Klinis Ikan Lele Dumbo Ukuran 7-8 cm Selama Pengamatan

Jenis pengamatan	Gejala klinis yang timbul	
	Ikan terinfeksi <i>Edwardsiella tarda</i>	Ikan control
Tingkah laku	Gerakan lemah, menggantung, nafsu makan kurang.	Normal
Tubuh/kulit	Warna tubuh pucat, terdapat luka pada tubuh	Normal
Sirip	Sirip pecah-pecah, warna sirip ekor tampak lebih merah dan sebagian terjadi pendarahan.	Normal

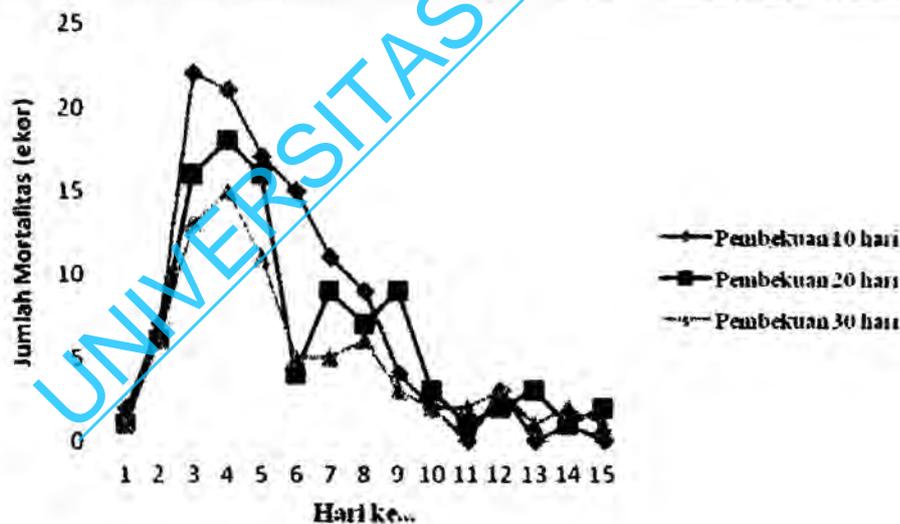


Gambar 4.9. Gejala Klinis Ikan Lele Dumbo Ukuran 7-8 cm Selama Pengamatan

Mortalitas pada ikan uji yang telah diinfeksi dengan bakteri *Edwardsiella tarda* mulai terjadi pada hari ke dua pasca penyuntikan dan terjadi peningkatan mortalitas pada hari ke tiga dan empat pasca infeksi. Kejadian tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh El-Yazeed & Ibrahim (2009) pada ikan catfish (*Clarias gariepinus*) dengan ukuran berat

160 gram/ekor, yang diinfeksi bakteri *Edwardsiella tarda* sebanyak 0,3 ml/ekor dengan dosis 10^8 CFU/ml standar Mac Farland.

Jumlah mortalitas ikan lele dumbo selama 15 hari pengamatan terjadi peningkatan pada hari ke dua dan ke tiga. Pada perlakuan 1 terjadi mortalitas sebanyak 22 ekor dihari ke tiga dan 21 ekor dihari ke empat dari sebanyak 120 ekor ikan uji untuk perlakuan 1. Pada perlakuan 2 terjadi mortalitas sebanyak 16 ekor dihari ke tiga dan 18 ekor dihari ke empat dari sebanyak 120 ekor ikan uji untuk perlakuan 2. Pada perlakuan 3 terjadi mortalitas sebanyak 13 ekor dihari ke tiga dan 15 ekor dihari ke empat dari sebanyak 120 ekor ikan uji untuk perlakuan 3. Tingkat mortalitas tiap perlakuan semakin menurun seiring dengan lamanya waktu pemeliharaan. Jumlah mortalitas setiap hari pengamatan dapat dilihat pada Gambar 4.10

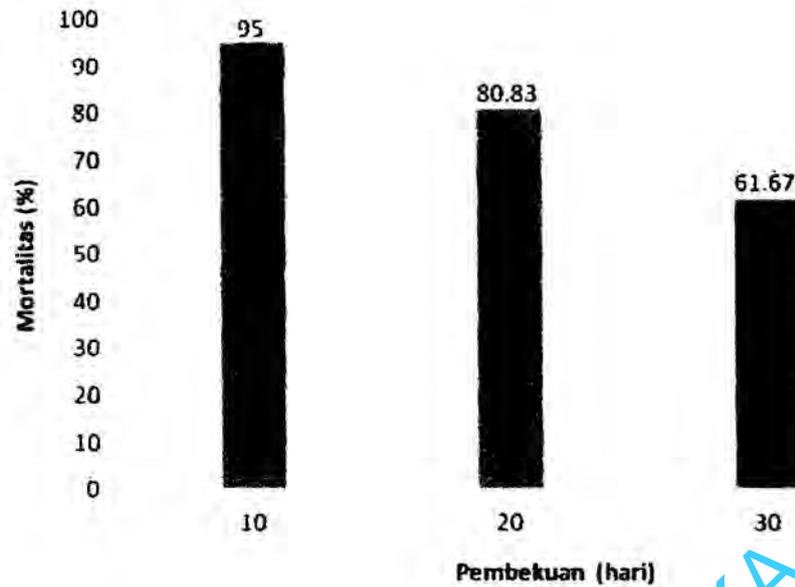


Gambar 4.10. Grafik Laju Mortalitas Ikan Lele Setiap Hari Selama Pengamatan

Tingkat persentase mortalitas ikan lele dumbo pada tiap perlakuan mengalami perbedaan yang cukup signifikan. Pada perlakuan 1, penyuntikan yang berasal dari ikan lele dumbo dengan masa penyimpanan 10 hari terjadi mortalitas sebanyak 95% dari keseluruhan ikan uji. Perlakuan 2, penyuntikan yang berasal dari ikan lele dumbo dengan masa penyimpanan 20 hari terjadi mortalitas sebanyak 80,83% dari keseluruhan ikan uji. Sedangkan pada perlakuan 3, penyuntikan yang berasal dari ikan lele dumbo dengan masa penyimpanan 30 hari terjadi mortalitas sebanyak 61,67% dari keseluruhan ikan uji.

Dari hasil pengamatan di atas terbukti bahwa bakteri *Edwardsiella tarda* masih bersifat patogen terhadap ikan lele dumbo hidup ukuran 7-8 cm dengan tingkat serangan yang berbeda tergantung dari lamanya penyimpanan pada suhu -20 °C.

Tingkat mortalitas ikan lele dumbo ukuran 7-8 cm yang telah diinfeksi suspensi *Edwardsiella tarda* yang diambil dari organ daging ikan lele dumbo dengan masa penyimpanan yang berbeda menunjukkan kecenderungan semakin lama penyimpanan, semakin menurun tingkat mortalitasnya. Persentase mortalitas ikan lele dumbo ukuran 7-8 selama pengamatan dapat dilihat pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11. Grafik Persentase Mortalitas Ikan Lele Dumbo Selama Pengamatan

Hasil analisis ragam dengan menggunakan tingkat kepercayaan pengujian sebesar 95% didapati nilai F hitung sebesar 29,49, F tabel 5% sebesar 3,68 dan F tabel 1% sebesar 6,36. Jika dibandingkan antara F hitung dengan F tabel 1%, maka F hitung $>$ F Tabel 1%, ini berarti perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap mortalitas ikan dumbo ukuran 7-8 cm. Hasil analisis ragam dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7. Analisis Ragam (Anova) Pengaruh Perlakuan Terhadap Mortalitas Ikan Uji.

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F-Hitung	F- Tabel	
					5 %	1 %
Perlakuan	2	3358,3	1679,15	29,49	3,68	6,36
Galat	15	854,2	56,94			
Total	17					

Hasil uji berganda Duncan (*Duncan Multiple Range Test*)

memperlihatkan hasil, yaitu :

$$R_p = q_\alpha \times S_y$$

$$S_y = \sqrt{\frac{2 \times RTG}{r}} = \sqrt{\frac{2 \times 86,94}{6}} = 4,36$$

P	2	3
$q_{\alpha=0.05}(p,15)$	3,01	3,16
S_y	4,36	4,36
R_p	13,11	13,89

Hasil uji berganda Duncan

Perlakuan (Penyimpanan pada suhu -20°C)	Rataan
P1 (10 hari)	95,00 a
P2 (20 hari)	80,83 b
P3 (30 hari)	61,67 c

dari hasil perhitungan di atas terlihat bahwa penyimpanan pada suhu -20°C dengan masa penyimpanan 10 hari (P1) memberikan pengaruh yang berbeda nyata dibandingkan dengan masa penyimpanan 20 hari (P2) dan 30 hari (P3), demikian juga perbandingan antara masa penyimpanan 20 hari (P2) terhadap masa penyimpanan 30 hari (P3) memberikan pengaruh yang berbeda nyata.

Pada perlakuan kontrol dari sebanyak 60 ekor ikan lele dumbo ukuran 7-8 cm masing-masing sebanyak 20 ekor tiap perlakuan, selama masa pengamatan 15 hari tidak terjadi mortalitas.

E. Parameter Kualitas air

Menurut Khairuman & Amri (2002), kualitas air merupakan suatu variabel yang dapat mempengaruhi kelangsungan hidup, pembenihan dan produksi ikan pada budidaya ikan. Kualitas air ditentukan oleh beberapa sifat kimia dan fisika air, yaitu: suhu, oksigen terlarut (DO), pH dan kandungan amoniak (NH_3).

Berdasarkan pengamatan selama penelitian, kualitas air pada akuarium penelitian menunjukkan kisaran yang normal untuk kelangsungan hidup ikan uji. Hasil pengukuran kualitas air selama pengamatan dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 4.8.

Tabel. 4.8. Kisaran Hasil Pengukuran Kualitas Air Selama Penelitian

Kualitas Air	Pagi	Sore	Kisaran Normal *)
Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	26,2 – 27,8	27,6 – 28,2	25 – 30
DO (mg/l)	7,2 – 8,4	7,4 – 8,7	> 3
pH	7,2 – 7,6	7,4 – 7,8	7 – 8
NH_3 (mg/l)	0,02 – 0,05	0,02 – 0,06	< 0,1

*) Khairuman & Amri (2002)

F. Pembahasan

Bakteri *Edwardsiella tarda* dikenal sebagai salah satu penyebab penyakit *Edwardsiellosis* atau lebih dikenal dengan *Emphisemathous Putrefactive Disease of Catfish* (EPDC). Nama EPDC diambil karena tepat menggambarkan penampilan yang kotor dan jorok ikan yang terkena infeksi *Edwardsiella tarda* (Meyer & Bullock, 1973).

Bakteri *Edwardsiella tarda* biasa menyerang species ikan di daerah tropis baik di perairan tawar maupun laut dan juga jenis reptil (Plumb, 1993). Bakteri ini juga dapat menyerang manusia dan menyebabkan penyakit *gastroenteritis* (radang lambung/usus), infeksi luka seperti selulitis atau gangren gas berhubungan dengan trauma pada permukaan mukosa/selaput lendir, dan *meningitis* (Janda & Abbot, 1993).

Hasil uji viabilitas pada penelitian ini membuktikan bahwa bakteri *Edwardsiella tarda* masih dapat bertahan hidup pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang dibekukan pada suhu -20°C selama masa penyimpanan 10, 20 dan 30 hari. Semakin lama masa penyimpanan didapati jumlah kandungan bakteri *Edwardsiella tarda* cenderung semakin menurun.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang pernah dilakukan oleh Brady & Vinitnantharat (1990), yang mendapati bahwa bakteri *Edwardsiella tarda* masih dapat bertahan hidup pada tubuh ikan channel catfish (*Ictalurus punctatus*) utuh yang disimpan pada suhu -20°C selama lebih dari 20 hari. Juga penelitian yang dilakukan oleh Setyaningsih, dkk. (2008), bahwa bakteri *Edwardsiella tarda* masih dapat bertahan hidup khususnya pada organ daging dan ginjal ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) utuh yang disimpan pada suhu -20°C sampai dengan hari ke 32 dengan kecenderungan semakin lama waktu penyimpanan, jumlah total bakteri setelah dihitung dengan metode *total plate count* semakin menurun.

Hasil uji patogenitas selama penelitian juga menunjukkan bahwa bakteri *Edwardsiella tarda* yang berasal dari ikan lele dumbo beku yang disimpan selama 10, 20 dan 30 hari pada suhu -20°C , ternyata masih bersifat patogen terhadap ikan lele dumbo ukuran 7-8 cm dan menimbulkan kematian pada ikan uji dengan tingkat mortalitas yang beragam tergantung dengan lamanya masa penyimpanan pada suhu -20°C . Tingkat mortalitas yang tertinggi sebesar 95% yang terjadi pada perlakuan 1, disusul perlakuan 2 sebesar 80,83% dan perlakuan 3 sebesar 61,67%.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Setyaningsih, dkk. (2008), bakteri *Edwardsiella tarda* yang diisolasi dari ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) yang telah dibekukan pada suhu -20°C selama 32 hari dan diinfeksi dengan dosis 10^5 CFU/ml standar Mac Farland no. 1 sebanyak 0,1 ml/ekor melalui suntikan secara intramuskular ke ikan patin hidup ukuran 10 gram/ekor sebanyak 50 ekor, menyebabkan kematian total pada ikan yang diinfeksi.

Hasil penelitian di atas membuktikan bahwa bakteri *Edwardsiella tarda* di dalam tubuh ikan lele dumbo beku masih dapat bertahan hidup dan masih bersifat patogen, walaupun disimpan pada suhu -20°C . Lamanya waktu penyimpanan mempengaruhi viabilitas dan patogenitas dari *Edwardsiella tarda*.

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Bakteri *Edwardsiella tarda* pada ikan lele dumbo yang telah dibekukan pada suhu -20°C dengan masa penyimpanan selama 10, 20 dan 30 hari terbukti masih mampu untuk bertahan hidup, dengan kecenderungan semakin lama waktu penyimpanan jumlah koloni bakteri *Edwardsiella tarda* semakin menurun.
2. Bakteri *Edwardsiella tarda* pada ikan lele dumbo yang telah dibekukan pada suhu -20°C dengan masa penyimpanan selama 10, 20 dan 30 hari terbukti masih bersifat patogen, hal ini diunjukkan dari terjadinya mortalitas ikan lele dumbo ukuran 7-8 yang diinfeksi dengan bakteri *Edwardsiella tarda* yang berasal dari ikan lele dumbo beku dengan masa penyimpanan 10, 20 dan 30 hari. Semakin lama masa penyimpanan, persentase mortalitas semakin menurun.

B. Saran

1. Perlu adanya pemeriksaan bakteri dengan target bakteri *Edwardsiella tarda* untuk pengiriman ikan lele beku, serta melarang pengiriman ikan lele beku apabila ternyata pada pemeriksaan laboratoris ditemukan bakteri *Edwardsiella tarda* terutama ke area yang belum terdeteksi adanya bakteri *Edwardsiella tarda*. Hal ini dimaksudkan sebagai tindakan pembatasan

penyebaran bakteri *Edwardsiella tarda* ke area yang belum terdeteksi bakteri *Edwardsiella tarda* dan dapat merugikan produksi perikanan.

2. Hasil penelitian membuktikan bahwa penurunan viabilitas dan patogenitas bakteri *Edwardsiella tarda* pada suhu -20°C memerlukan waktu yang cukup lama, maka perlu adanya penelitian lebih lanjut terkait dengan penyimpanan ikan konsumsi beku pada tingkatan suhu dan lamanya masa penyimpanan yang berbeda serta pengaruh pembekuan cepat (*quick freezing*) dengan suhu di bawah -20°C , terhadap viabilitas maupun patogenitas bakteri *Edwardsiella tarda*.

UNIVERSITAS TERBUKA

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, S.M. (1990). Status and Use of Biological Indicators for Evaluating the Effects of Stress on Fish. *American Fisheries Society Symposium*, 1-8.
- Afrianto, E & Liviawaty. (1989). *Pengawetan dan Pengolahan Ikan*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Afrianto, E & Liviawaty. (1992). *Pengendalian Hama Dan Penyakit Ikan*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Anonim. (2005). Kamus Besar Bahasa Indonesia. Diambil 15 Juli 2012, dari situs World Wide Web <http://www.kamusbesar.com/43188/viabilitas>
- Anonim. (2007). *Petunjuk Praktikum Penyakit Ikan Bakterial Tingkat Ahli Karantina Ikan. Laboratorium Hama dan Penyakit Ikan, Jurusan Perikanan*, Yogyakarta: Fakultas Pertanian UGM.
- Anonim. (2008). Mikroorganisme. Diambil tanggal 4 Oktober 2011, dari situs World Wide Web <http://Antiserra.wen.su/coccus.html>
- Anonim. (2008). Pertumbuhan Bakteri dan Suhu. Diambil tanggal 15 Juli 2012, dari Blog Mahasiswa Pendidikan Biologi Universitas Negeri Malang <http://iqbalali.com/2008/04/21/pertumbuhan-bakteri-dan-suhu>
- Anonim. (2009). Refrigerated Counteiner. Diambil tanggal 4 Oktober 2011, dari situs World Wide Web http://en.wikipedia.org/wiki/Refrigerated_container
- Austin, B & D.A Austin. (1987). *Bacterial fish Pathogens; Diseases in Farmed and Wild Fish*. Ellis Horwood Limited. Chichester West Sussex, England.
- Austin, B. & D.A. Austin. (2007). *Bacterial fish pathogens – Diseases of Farmed and Wild Fishes*. 4th Edition. Praxis Publishing Ltd, Chichester.
- Balai Karantina Ikan Kelas II Tanjung Priok. (2011). *Laporan Kegiatan Operasional Tahun Anggaran 2010*, Jakarta: Pusat Karantina Ikan
- Brady, Y.J & Vinitnantharant, S. (1990). Viability of Bacterial Pathogens in Frozen Fish. *Journal of Aquatics Animal Health*, 2, 149-150
- Biro Hukum, (2010). *Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor : KEP.03/MEN/2010 tentang Penetapan Jenis-jenis Hama Penyakit Ikan Karantina, Golongan, Media Pembawa dan Sebarannya*. Jakarta: Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Biro Hukum. (2010). *Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Nomor : PER.12/MEN/2010 tentang Minapolitan*. Jakarta: Kementerian Kelautan dan Perikanan.

- Boyd, C.E. (1990). *Water Quality in Ponds for Aquaculture*. Birmingham Publishing Company. Birmingham, Alabama
- Chen, J.D. & Shau Yan Lai. (1998). PCR for Direct Detection of *Edwardsiella tarda* from Infected Fish and Environmental Water by Application of Hemolysin Gen. *Zoological Studies* 37(3): 169-178.
- Cholik, F., Artati & R. Arifudin. (1991). *Pengelolaan Kualitas Air Kolam*. INFIS Manual Seri N0. 16/1991. Jakarta: Direktorat Jenderal Perikanan.
- Cowan, S.T & Steels. (1987). *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Effendi, I, dkk. (2007). *Budidaya Perikanan*. Jakarta: Universitas Terbuka.
- El-Yazeed, H.A. & Mai D. Ibrahim. (2009). Studies on *Edwardsiella tarda* Infection in Cat Fish and *Tilapia nilotica*. *Bent-Suef Veterinary Medical Journal*. V(19), 1. P. 44-50.
- Faddin, J.F.M. (1980) *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*. London : William & Wilkins. Second Edition. 527 pages
- Galal, N.F., S.G.M. Ismail, R.H. Khalis & M.K. Soliman. (2005) Studies on *Edwardsiella* infection in *Oreochromis niloticus*. Egyptian journal of aquatic research Vol. 31,1,2005. Diambil tanggal 6 Februari 2012, dari situs World Widw Web <http://www.nodc-egypt.org>
- Hanafiah, K.I. (1991). *Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi*. Jakarta: CV. Rajawali.
- Hanafiah, K.I. (2005). *Rancangan Percobaan Aplikatif*. Jakarta: PT. Rajagrafindo Persada.
- Hawke, J.P & R.L. Thune. (1994). *Edwardsiella tarda* Septicemia dalam: *Sugested Procedur for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens*. J.C Thoesen (eds). Fourth Edition. Fish Health Section. 1-3.
- Herman, dkk. (2007). *Metodologi Penelitian*. Jakarta: Universitas Terbuka.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T & Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore : Williams & Wilkins. Ninth Edition. Page 175-178.
- Ibrahim M.D., Shaheed, I.B., El-Yazeed, H.A & Korani, H. (2011). *Assessment of the susceptibility of polyculture reared African Catfish and Nile tilapia to Edwardsiella tarda*. *Journal of American Science*, 2011; 7(3). Diambil tanggal 6 Februari 2012, dari situs World Wide Web <http://www.iofamericanscience.org>

- Janda, J.M and Abbott, S.L (1993). *Infections associated with the genus Edwardsiella: the role of Edwardsiella tarda in human disease*, Clin. Infect. Dis. 17 742–748 In: B R Mohanty and P K Sahoo, 2007, Edwardsiellosis in fish: a brief review, J. Biosci. 32 1331–1344
- Kamiso, H.N. & Triyanto. (1991). *Penyakit Bakterial pada Ikan Air Tawar yang Terdapat di Indonesia dan Luar Negeri. Workshop Penetapan Hama dan Penyakit Ikan Karantina*. Cipanas-Bogor, 10-12 September 1991. 30 hal.
- Khairuman & Amri, K. (2002). *Budidaya Lele Dumbo Secara Intensif*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Khairuman & Amri, K (2011). *Pembenihan Lele 21 Hari Balik Modal*. Jakarta: PT. Agromedia Pustaka.
- Kusriningrum (2010). *Rancangan Acak Lengkap (RAL) Completely Randomized Design or Fully Randomized Design*. Diambil tanggal 6 Oktober 2011, dari situs World Wide Web <http://www.fkh.unair.ac.id/materi/Rancob/Kuliah/Rancob/04.R...-37k>
- Lantiani, D., Susanti, D., Achmad, H., & Setiyanto, R. (2010). *Petunjuk Praktis Pembuatan dan Pembacaan Uji Biokimiawi Bakteri*. Yogyakarta: Stasiun Karantina Ikan Kelas I Adisucipto.
- Lehninger, A.L.(1995). *Dasar-dasar Biokimia*, Jilid I, diterjemahkan oleh DR. Ir. Maggy Thenawidjaya. Jakarta: Erlangga.
- Meyer, F.P. & Bullock, G.L. (1973). *Edwardsiella tarda*, a New Pathogens of Channel Catfish *Ictalurus punctatus*. *Applied Microbiology* V(25) 1. 155-156.
- Mac Faddin, J.F. (1980). *Individual Biochemical Test in Bacteria*, 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore: 1-320.
- Mahyuddin, K. (2008). *Panduan Lengkap Agribisnis Lele*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Meng Du, Jixiang Chen, Xiaohua, Aijuan Li & Yingeng Wang. (2007). Retention of Virulence in a Viable but Nonculturable *Edwardsiella tarda* Isolate. *Applied and Microbiology*, V(73) 4. 1349-1354.
- Muchtadi, D. (2007). *Pengolahan Hasil Perikanan*. Jakarta: Universitas Terbuka.
- Murniyati, A.S & Sunarman. (2004). *Pendinginan, Pembekuan, dan Pengawetan Ikan*, Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Nabib, R. & F.H. Pasaribu. (1989). *Patologi dan Penyakit Ikan*. PAU. Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. 156 hal.

- Nurlaila, dkk. (2010). *Petunjuk Teknis Identifikasi dan Preservasi Bakteri Edwardsiella tarda*. 81 hal. Jakarta: Balai Uji Standar Karantina Ikan Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan. Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Noga, Edward. J. (2000). *Fish Disease Diagnosis and Treatment*. Iowa: First Iowa State University Press Edition. 147-149.
- Prescod, M. B. (1973). *Investigation of Rational Effluent and Stream Standards for Tropical Countries*. Asian Institute of Technology Bangkok, Thailand. San Fransisco: Far East APD US Army Research and Development Group.
- Plumb, J.A. (1993). *Edwardsiella Septicemia*. dalam: *Bacterial Diseases of Fish*. Inglis, V., R.J. Roberts & N.R. Bromage (eds). Blackwell Science Ltd. London. 61-79.
- Post, G. (1987). *Textbook of Fish Health*. USA: T.F.H. Publications, Inc.
- Pusat Karantina Ikan. (2007). *Metode Standar Pemeriksaan HPIK Golongan Bakteri Edwardsiella tarda*. Dokumen 5. Jakarta: Pusat Karantina Ikan Departemen Kelautan dan Perikanan.
- Rizky, A.R., Prabandono, K., Firma, Hudayafi, S.U. (2003). *Laporan Uji Coba Aplikasi Metode PCR untuk Deteksi Isolat Edwardsiella tarda dari Unit Pelaksana Teknis Lingkup Pusat Karantina Ikan*. Jakarta: Balai Uji Standar Karantina Ikan.
- Septiama, dkk. (2008). *Metode Standar Pemeriksaan HPIK Golongan Bakteri Edwardsiella tarda*. 33 hal. Jakarta: Pusat Karantina Ikan.
- Setyaningsih, T., N. Muslimah, R. Santoso, W. Supriyono, Rubiatun, R. Hamidah, dan A. Khoiri. (2008). *Daya Tahan Edwardsiella tarda pada Ikan Patin (Pangasius hypophthalmus) Beku*. Prosiding Hasil Uji Coba Tahun 2008. Jakarta: Pusat Karantina Ikan.
- Stasiun Karantina Ikan Kelas I Adisucipto Yogyakarta. (2010). *Petunjuk Praktis Pembuatan dan Pembacaan Uji Biokimiawi Bakteri*. Yogyakarta: Stasiun Karantina Ikan Kelas I Adisucipto Yogyakarta. Pusat Karantina Ikan. Kementerian Kelautan dan Perikanan. Edisi kedua.
- Wademayer, G.A., F.P. Mayer & L. Smith. (1976). *Environmental Stress and Fish Diseases. Book 5*. dalam: *Diseases of Fish*. S.F. Snieszko & H.R. Axelrod (eds). TFH Publication, Neptune City.
- Walters, G.R. & J.A. Plumb. (1990). *Environmental Stress and Bacterial Infection in Channel Catfish, Ictalurus punctatus Rafinesque*. *J. Fish Biology* 17: 177-185

- Yuasa, K., Panigoro, N., Bahnan, M., & Kholidin, E.B. (2003). *Panduan Diagnosa Penyakit Ikan*. Jambi: Balai Budidaya Air Tawar.
- Verjan, N, Hirono, I & Aoki, T. (2005). Genetic Loci of Major Antigenic Protein Genes of *Edwardsiella tarda*, *American Society for Microbiology*, V(71) No.9. 5654-5658.
- Zonneveld, N., E.A. Huisman & J.H. Boon. (1991). *Prinsip-prinsip Budidaya Ikan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

UNIVERSITAS TERBUKA

Lampiran 1. Perhitungan Analisis Data Jumlah Koloni Bakteri *Edwardsiella Tarda* (CFU/gram) pada Ikan Lele Dumbo Beku dengan Masa Penyimpanan 10, 20 dan 30 Hari

Data awal

Ulangan	Lama penyimpanan pada suhu -20 °C		
	10 hari	20 hari	30 hari
1	10,6 x 10 ⁶	11,3 x 10 ⁶	7,3 x 10 ⁶
2	10,8 x 10 ⁶	9,7 x 10 ⁶	7,5 x 10 ⁶
3	10,4 x 10 ⁶	9,8 x 10 ⁶	9,0 x 10 ⁶
Rata-rata	10,6 x 10 ⁶	10,2 x 10 ⁶	7,9 x 10 ⁶

Transformasi log data

Ulangan	Lama penyimpanan pada suhu -20 °C			
	10 hari	20 hari	30 hari	
1	7,0253	7,0531	6,8633	
2	7,0334	6,9868	6,8751	
3	7,0170	6,9912	6,9542	
Jumlah	21,0758	21,0311	20,6926	1314,6787

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = \frac{(\sum x_{ij})^2}{rk} = \frac{(1314,6787)^2}{3 \times 3} = 438,1970$$

$$\begin{aligned} \text{JK Total (JKT)} &= \sum X_{ij}^2 - FK \\ &= (7,0253^2 + 7,0334^2 + \dots + 6,9542^2) - 438,1970 = 0,0370 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Perlakuan (JKP)} &= \sum X_j^2 / r - FK \\ &= (21,0758^2 + 21,0311^2 + 20,6926^2) / 3 - 438,1970 \\ &= 438,2262 - 438,1970 = 0,0293 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Galat (JKG)} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 0,0370 - 0,0293 = 0,0077 \end{aligned}$$

$$\text{Derajat bebas Total (dbT)} = rk - 1 = 3 \times 3 - 1 = 9 - 1 = 8$$

$$\text{Derajat bebas Perlakuan (dbP)} = k - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$\text{Derajat bebas Galat (dbG)} = \text{dbT} - \text{dbP} = 8 - 2 = 6$$

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat Tengah Perlakuan (KTP)} &= \text{JKP} / \text{dbP} \\ &= 0,0293 / 2 = 0,0146 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat Tengah Galat (KTG)} &= \text{JKG} / \text{dbG} \\ &= 0,0077 / 6 = 0,0013 \end{aligned}$$

$$F \text{ hitung} = \text{KTP} / \text{KTG} = 0,0146 / 0,0013 = 11,2929$$

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Viabilitas

Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
10	7,0252543	,00819533	3
20	7,0103588	,03706332	3
30	6,8975422	,04945342	3
Total	6,9777184	,06803751	9

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Viabilitas

F	df1	df2	Sig.
5,172	2	6	,049

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Viabilitas

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Perlakuan	,029	2	,015	11,293	,009
Error	,008	6	,001		
Corrected Total	,037	8			

a. R Squared = ,790 (Adjusted R Squared = ,720)

Post Hoc Tests

Perlakuan

Homogeneous Subsets

Viabilitas

Duncan

Perlakuan (hari)	N	Subset	
		1	2
30	3	6,8975422	
20	3		7,0103588
10	3		7,0252543
Sig.		1,000	,630

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,001.

Lampiran 2. Perhitungan Analisis Data Mortalitas Ikan Lele Dumbo Ukuran 7-8 cm Selama 15 hari pengamatan

Ulangan	Penyimpanan suhu -20 °C (hari)			Total
	10	20	30	
1	90	75	65	
2	85	90	75	
3	100	75	60	
4	100	85	55	
5	95	90	60	
6	100	70	55	
Σ	570	485	370	1425

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = \frac{(\Sigma x_{ij})^2}{rk} - \frac{(1425)^2}{3 \times 6} = 112812.5$$

$$\begin{aligned} \text{JK Total (JKT)} &= \Sigma X_{ij}^2 - FK \\ &= (90^2 + 85^2 + \dots + 55^2) - 112812.5 = 4212.5 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Perlakuan (JKP)} &= \Sigma X_j^2 / r - FK \\ &= (570^2 + 485^2 + 370^2) / 3 - 112812.5 = 116170.8 - 112812.5 = 3358.3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Galat (JKG)} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 4212.5 - 3358.3 = 854.2 \end{aligned}$$

$$\text{Derajat bebas Total (dbT)} = rk - 1 = 6 \times 3 - 1 = 18 - 1 = 17$$

$$\text{Derajat bebas Perlakuan (dbP)} = k - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$\text{Derajat bebas Galat (dbG)} = \text{dbT} - \text{dbP} = 17 - 2 = 15$$

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat Tengah Perlakuan (KTP)} &= \text{JKP} / \text{dbP} \\ &= 3358.3 / 2 = 1679.15 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat Tengah Galat (KTG)} &= \text{JKG} / \text{dbG} \\ &= 854.2 / 15 = 56.94 \end{aligned}$$

$$F \text{ hitung} = \text{KTP} / \text{KTG} = 1679.15 / 56.94 = 29.49$$

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Mortalitas

Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
10	95.00	6.325	6
20	80.83	8.612	6
30	61.67	7.528	6
Total	79.17	15.741	18

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Mortalitas

F	df1	df2	Sig.
.855	2	15	.445

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Mortalitas

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Perlakuan	3358.333	2	1679.167	29.488	.000
Error	854.167	15	56.944		
Total	117025.000	18			
Corrected Total	4212.500	17			

a. R Squared = .797 (Adjusted R Squared = .770)

Post Hoc Tests

Perlakuan

Homogeneous Subsets

Mortalitas

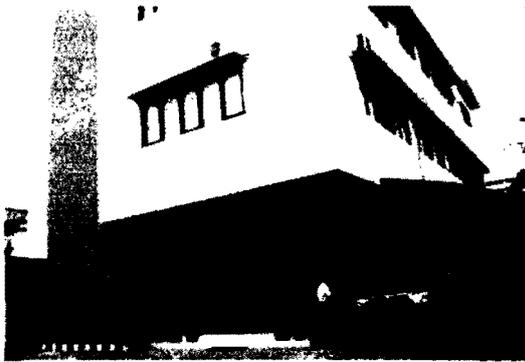
Duncan

Perlakuan	N	Subset		
		1	2	3
30	6	61.67		
20	6		80.83	
10	6			95.00
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 56.944.

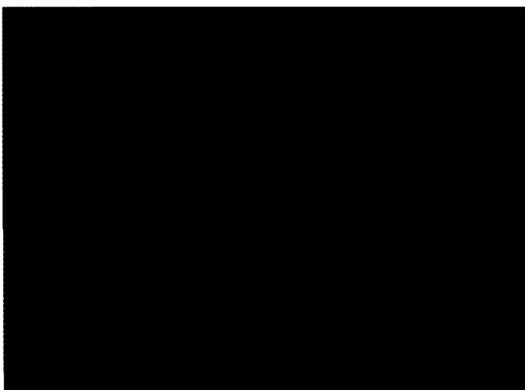
Lampiran 3. Foto-foto Penelitian



Gedung Laboratorium BKI Tj. Priok



Kultur Isolat *Edwardsiella tarda*



Koloni *Edwardsiella tarda* di media



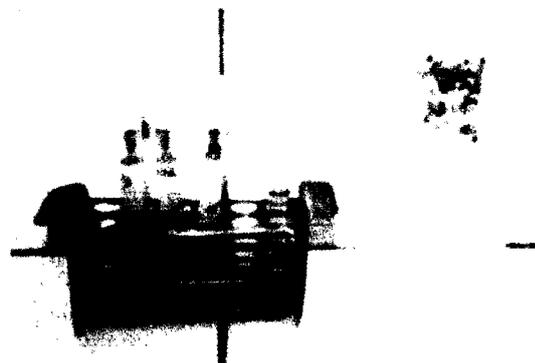
Ekstraksi DNA *Edwardsiella Tarda*



Pengukuran panjang, berat, dan penyuntikan ikan uji



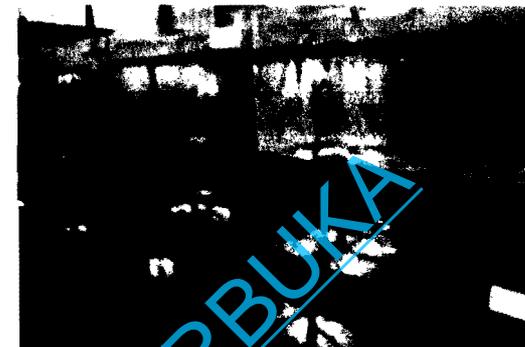
Pembuatan suspensi *Edwardsiella tarda*



Larutan *Edwardsiella tarda*



Penyuntikan suspensi *Edwardsiella tarda* ke Ikan lele dumbo ukuran 7-8 cm

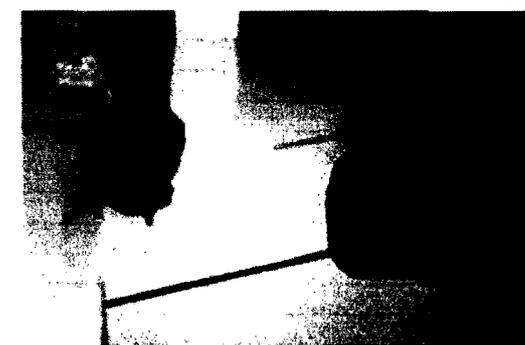


Ikan Lele dumbo ukuran 7-8 cm Pasca Penyuntikan suspensi *Edwardsiella tarda*



Lele dumbo pasca penyuntikan hari ke 3

Kematian ikan uji hari ke 3 pengamatan



Pengukuran kualitas air akuarium pengamatan

Lampiran 4.

BIODATA PENULIS

- Nama** : Iwan Supriadi
- Tempat / Tgl. Lahir** : Palembang, 24 September 1969
- Alamat Rumah** : Jl. Kabandungan 2 No. 58 Rt. 02 Rw. 11
Desa Sirnagalih Kecamatan Tamansari
Kabupaten Bogor – 16610
- Email** : supriadi.iwan@gmail.com
- Pendidikan** :
1. SD Muhammadiyah I Palembang
Tahun Lulus : 1982
 2. SMP Muhammadiyah I Palembang
Tahun Lulus : 1985
 3. SPP- SUPM Bogor
Tahun Lulus : 1988
 4. Universitas Muhammadiyah Palembang
Fak. Pertanian Jurusan Budidaya Perairan
Tahun Lulus : 2003
- Pengalaman Bekerja** :
1. Stasiun Karantina Ikan Bandara Internasional
Soekarno-Hatta Jakarta
Sejak tahun 1989 s/d 1991
 2. Pos Karantina Ikan Supadio Pontianak
Sejak tahun 1991 s/d 1995.
 3. Pos Karantina Ikan Lintas Batas Entikong
Sejak tahun 1995 s/d 1997
 4. Stasiun Karantina Ikan Bandara SMB II Palembang
Sejak tahun 1997 s/d 2006
 5. Balai Karantina Ikan Tanjung Priok Jakarta
Sejak tahun 2006 s/d 2010
 6. Pusat Karantina Ikan – BKIPM
Sejak tahun 2010 s/d sekarang