

PENGUJIAN OBAT KIMIA UNTUK MENGHAMBAT PERTUMBUHAN BAKTERI PATOGEN *Aeromonas hydrophila* SECARA IN VITRO DAN IN VIVO

THE TESTING OF CHEMICAL MEDICINE FOR RETARDING OF PATHOGENIC BACTERIUM *Aeromonas hydrophila* GROWTH UNDER IN VITRO AND IN VIVO

Mohamad Iqbal Kurniawinata¹⁾, Dian Eka Ramadhani^{1)*}, Deby Shinta¹⁾, Abrisam Hadi
Bintoro¹⁾, Herlina Indryani¹⁾, Adhitya Wibisono¹⁾, Shadam Dwi Permana¹⁾, R Riza
Pamungkas¹⁾, Nisa Puziah¹⁾, Athaya Maula¹⁾, Sarah Sabilla Fauziah¹⁾, Muhamad Erlan
Hafid¹⁾, Nazla Wafi Nurrafa¹⁾, Monic Hapsari¹⁾, Rifqah Pratiwi²⁾

¹Program Studi Teknologi Produksi dan Manajemen Pembenihan Ikan, Sekolah Vokasi, IPB University, Jl. Kumbang
No.14, Kota Bogor, Jawa Barat, 16128

²Program Studi Teknik Budidaya Perikanan, Politeknik Kelautan dan Perikanan Kupang, Jl Kampung Baru, Pelabuhan
Fery Bolok, Kupang, 85351, Indonesia

*Corresponding Author: dianeka06@apps.ipb.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan jenis obat kimia dan dosis terbaik untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* (AHA). Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kesehatan dan Lingkungan Sekolah, Program Studi Teknologi dan Manajemen Pembenihan Ikan, Sekolah Vokasi IPB. Rancangan percobaan yang dilakukan dari penelitian ini terdiri dari 4 perlakuan, diantaranya, kontrol (K), garam ikan 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L, 30 g/L, methylene blue 0,5 mL/L, 1,0 mL/L, 1,5 mL/L, 2 mL/L, 2,5 mL/L, 3 mL/L, lukastop 0,01 mL/L, 0,013 mL/L. Pengujian obat dilakukan secara in vitro dengan pengujian tunggal dan gabungan masing-masing obat. Pengujian in vivo dilakukan dengan dosis terbaik dari hasil in vitro diujikan pada ikan sebagai pengobatan pada infeksi bakteri AHA. Parameter in vitro yang diamati yaitu zona hambat dan total bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*, sedangkan parameter in vivo yang diamati yaitu Survival Rate (SR), Laju Pertumbuhan Harian (LPH) dan Mortality Rate (MR). Hasil pengujian in vitro pada pengujian tunggal yang terbaik didapatkan pada perlakuan methylene blue 3 mL/L dengan zona hambat sebesar 18,25 mm dan jumlah bakteri AHA terendah yaitu $5,197 \times 10^9$ CFU/mL. Hasil pengujian in vitro pada pengujian gabungan yang terbaik didapatkan pada perlakuan garam ikan 25 g/L dan methylene blue 3 mL/L dengan zona hambat 17,9 mm. Hasil pengujian in vivo pengobatan dengan methylene blue 3 mL/L, menghasilkan nilai SR 80% dan mampu membantu penyembuhan pasca infeksi serta meningkatkan nafsu makan ikan.

Kata kunci: *Aeromonas hydrophila*, dosis, garam ikan, lukastop, methylene blue

ABSTRACT

This study aims to obtain the best type of chemical drug and dosage to inhibit the growth of the pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila* (AHA). This study was conducted at the School Health and Environment Laboratory, Fish Seed Technology and Management Study Program, IPB Vocational School, Sukabumi Campus. The experimental design carried out in this study consisted of 4 treatments, including control (K), fish salt 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L, 30 g/L, methylene blue 0,5 mL/L, 1,0 mL/L, 1,5 mL/L, 2,0 mL/L, 2,5 mL/L, 3,0 mL/L, lukastop 0,01 mL/L, 0,013 mL/L. Drug testing was carried out in vitro with single and combined testing of each drug. In vivo testing was carried out with the best dose from the in vitro results tested on fish as a treatment for AHA bacterial infections. The observed in vitro parameters were the inhibition zone and total pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*, while the observed in vivo parameters were survival rate (SR), daily growth rate (LPH), and mortality rate (MR). In vitro tests showed that methylene blue 3 mL/L treatment had the best results on a single test. The inhibition zone was 18,25 mm, and the number of AHA bacteria in the sample was $5,197 \times 10^9$ CFU/mL. The treatment of 25 g/L fish salt and 3 mL/L methylene blue yielded the best in vitro test results, with an inhibition zone of 17,9 mm. The results of vivo therapy testing with 3 mL/L methylene blue produced an SR value of 80% and were able to aid in post-infection healing and increase fish appetite.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, dosage, fish salt, lukastop, methylene blue

PENDAHULUAN

Salah satu penyakit yang sering menginfeksi ikan air tawar adalah *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan gejala klinis berupa bercak merah dan borok pada tubuh ikan (Sinubu et al 2022). Ikan yang terinfeksi oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* biasanya mengalami pendarahan yang luas pada permukaan kulit, yang dikenal sebagai septicemia hemoragik. Hal ini sering diikuti dengan munculnya luka terbuka atau ulser pada permukaan tubuh, bahkan bisa menjalar hingga ke dalam jaringan (Mangunwardoyo et al 2016). Bakteri ini dapat menyebabkan tingkat kematian tertinggi, yaitu 80% - 100% (Astria et al 2017). Habitat bakteri yang disebutkan di atas terutama ditemukan di air tawar, tanaman air, dan tubuh ikan. Ini menghadirkan resiko infeksi yang signifikan untuk berkembang ikan, karena stres dan kondisi lingkungan yang sedikit tidak sehat.

Pencegahan yang dilakukan saat terserang bakteri *Aeromonas hydrophila* umumnya dapat menggunakan obat-obatan kimia maupun antibiotik (Nur et al 2017). Beberapa obat-obatan kimia yang digunakan diantaranya methylene blue, garam ikan, dan lukastop. Methylene blue memiliki kandungan sebagai anti jamur dan anti parasit (Sulistiani et al 2017). Obat tersebut umumnya digunakan untuk merawat telur ikan untuk memastikan tidak terdapat pertumbuhan jamur pada telur. Selain itu, methylene blue juga digunakan untuk pengobatan keracunan akibat nitrit dan amonia. Garam ikan digunakan untuk membantu meningkatkan fungsi insang ikan, menyembuhkan penyakit kulit ikan, dan menghambat patogen. Selain itu, garam ikan juga dapat membantu mengatasi parasit yang menempel pada ikan peliharaan. Lukastop digunakan sebagai obat anti luka dan anti jamur. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan dosis terbaik dan obat kimia terbaik untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada April-Mei di Laboratorium Kesehatan dan Lingkungan

Perikanan, Program Studi Teknologi dan Manajemen Pembenihan Ikan, Jl. Sarasa No 45, Babakan, Kec. Cibeureum, Kota Sukabumi, Sekolah Vokasi IPB Sukabumi.

Persiapan alat dan bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya untuk pengujian secara in vitro dan in vivo. Alat yang digunakan untuk pengujian secara in vitro antara lain hotplate, erlenmeyer, autoclave, jangka sorong, cawan petri, eppendorf, waterbath shaker, set alat aseptik dan inkubator. Bahan yang digunakan untuk pengujian secara in vitro antara lain: media *Tryptic Soy Broth* (TSB), aluminium foil, media *Tryptic Soy Agar* (TSA), dan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Alat dan bahan yang digunakan untuk pengujian secara in vivo antara lain set akuarium, syringe, methylene blue, garam ikan, lukastop, pakan ikan, binder, dan benih ikan nila berukuran 6-10 cm.

Rancangan Percobaan

Pengujian secara in vitro

Rancangan percobaan secara in vitro pada penelitian ini terdiri dari 4 perlakuan, diantaranya, kontrol (K), garam ikan 5 g/L, garam ikan 10 g/L, garam ikan 15 g/L, garam ikan 20 g/L, garam ikan 25 g/L, garam ikan 30 g/L, methylene blue 0,5 µl/mL, methylene blue 1 µl/mL, methylene blue 1,5 µl/mL, methylene blue 2 µl/mL, methylene blue 2,5 µl/mL, methylene blue 3 µl/mL, lukastop 0,01 µl/mL, lukastop 0,013 µl/mL. Setiap dosis diujikan secara tunggal dengan metode zona hambat. Hasil terbaik dari setiap uji tunggal tersebut kemudian dilakukan uji kultur bersama untuk mendapatkan jumlah bakteri *Aeromonas hydrophila* yang dapat dihambat oleh hasil terbaik tersebut. Selanjutnya, setiap obat yang diujikan tunggal tersebut digabung untuk mendapatkan data interaksi obat terbaik dengan menguji zona hambat.

Prosedur pembuatan larutan obat kimia

Bahan kimia garam ikan dilarutkan dengan akuades sesuai dosis yang digunakan untuk pengujian. Obat cair seperti methylene blue dan lukastop diambil menggunakan mikropipet dan digunakan langsung untuk pengujian.

Prosedur pembuatan media

Media yang digunakan dalam pengujian secara in vitro yaitu media TSA, TSB dan phosphate buffer

saline (PBS). Prosedur pembuatan media TSA diawali dengan menimbang media *Tryptic Soy Broth* (TSB) sebanyak 3 g dan media agar sebanyak 1,5 g, ditambahkan akuades 100 mL. Tutup erlenmeyer yang berisikan media dengan alumunium foil dan dipanaskan menggunakan *hotplate* sampai mendidih. Selanjutnya media diautoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 0.1 MPa. Setelah itu ditunggu selama 30 menit hingga suhu media menurun dan dituang dalam cawan petri steril secara merata. Sedangkan untuk membuat media TSB, seluruh bahan ditimbang tanpa media agar.

Cara pembuatan media PBS yaitu masukkan KH_2PO_4 1,179 g, Na_2HPO_4 sebanyak 4,303 g, NaCl 9 g dan akuades 500 mL. Semua bahan dihomogenkan ke dalam gelas beaker 1000 mL dan diukur pH larutan menggunakan pH meter. Target pH medium yaitu 7,4 dan apabila kurang dari nilai tersebut maka ditambahkan NaOH 0,1 M.

Prosedur pembuatan kultur bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* (AHA)

Bakteri patogen yang digunakan berusia 24 jam dan ditumbuhkan dalam media TSB. Sebanyak satu ose biakan bakteri dimasukkan ke dalam 10 mL media TSB, kemudian diinkubasi dalam shaker selama 24 jam pada suhu ruangan dengan kecepatan 140 rpm. Selanjutnya bakteri dipanen dan siap digunakan untuk pengujian secara in vitro maupun in vivo.

Pengujian Zona Hambat

Pengujian zona hambat dilakukan dengan menyiapkan biakan bakteri patogen, media TSA cawan petri, pinset, eppendorf, dan kertas cakram. Metode yang digunakan menggunakan Kirby-Bauer. Pertama, setiap media TSA disebar bakteri AHA sebanyak 100 µL. Selanjutnya setiap kertas cakram dicelupkan pada setiap bahan kimia beserta larutan PBS (sebagai kontrol) pada media TSA yang sudah disebar bakteri AHA. Selanjutnya, proses inkubasi dilakukan dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 29°C. Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong.

Penghitungan Jumlah Bakteri

Penghitungan jumlah bakteri dilakukan menggunakan metode penghitung total koloni (*Total Plating Count/TPC*). Sebanyak 800 µL, bahan kimia 100 µL, dan bakteri AHA 100 µL

dimasukkan ke dalam eppendorf dan diinkubasi pada shaker selama 24 jam pada suhu ruang dan kecepatan 140 rpm. Selanjutnya dilakukan TPC dengan cara setiap eppendorf diisi dengan 900 µL PBS dan ditambahkan 100 µL kultur bakteri yang telah ditambahkan bahan kimia. Lakukan pengenceran dari 10^{-1} hingga 10^{-6} , setelah itu pada pengenceran 10^{-5} hingga 10^{-6} disebar 100 µL dalam media TSA cawan petri. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 29°C.

Prosedur Pengujian In Vivo

Pengujian in vivo dilakukan dengan cara perendaman dalam wadah 1 L. Benih ikan nila direndam dalam larutan AHA selama 10 menit kemudian benih ikan nila dikembalikan dalam akuarium dan dipelihara selama 2 hari. Selama masa infeksi, ikan diberikan pakan normal. Setelah itu pada hari ke-3 diberikan pengobatan dengan hasil terbaik pengujian obat baik secara tunggal dan gabungan. Benih ikan nila dipelihara dalam akuarium hingga hari ke-14 hari dan diberikan pakan tanpa tambahan suplemen pakan.

Parameter Uji

Diameter zona hambat

Pengukuran pertumbuhan bakteri pada penelitian ini yaitu dilakukan parameter pengukuran diameter zona hambat. Ukuran diameter zona hambat ditunjukkan dengan adanya zona bening yang tidak ditumbuhi bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* pada sekitar kertas cakram dalam satuan milimeter (mm).

Penghitungan jumlah koloni bakteri

Metode hitungan cawan ini didasarkan pada prinsip bahwa setiap sel yang hidup akan berkembang menjadi satu koloni. Persyaratan statistik, cawan yang dipilih untuk penghitungan koloni yang memiliki jumlah koloni antara 30-300 koloni. Setelah itu dilakukan penghitungan total bakteri menggunakan rumus berikut ini (Reynolds *et al.* 2005):

$$\text{Jumlah koloni bakteri} = \frac{\text{rata-rata jumlah koloni (CFU)}}{\text{pengenceran} \times \text{volume sebar}}$$

Survival Rate (SR)

Kelangsungan hidup merupakan persentase ikan yang hidup pada akhir pemeliharaan dari jumlah awal ikan yang dipelihara dalam wadah. Kelangsungan hidup ikan dapat diperoleh melalui rumus (Nimrat *et al.* 2022):

$$SR (\%) = \frac{N_t}{N_o} \times 100$$

Keterangan:

SR : Survival rate (%)

Nt : Jumlah individu pada akhir penelitian (ekor)

No : Jumlah individu pada awal penelitian (ekor)

Mortality Rate (MR)

Penghitungan *mortality rate* atau tingkat kematian ikan nila dihitung menggunakan rumus (Barlow 1984):

$$MR = \frac{\text{jumlah ikan yang mati selama satu periode}}{\text{jumlah penebaran ikan awal}} \times 100$$

Laju Pertumbuhan Harian (LPH)

Laju pertumbuhan harian merupakan % dari selisih berat akhir dan berat awal, dibagi dengan lamanya waktu pemeliharaan (Abbas et al 2021):

$$LPH = \left(\sqrt[t]{\frac{W_t}{W_o}} - 1 \right) \times 100$$

Keterangan:

LPH : laju pertumbuhan harian (%/hari)

Nt : berat rata-rata ikan pada akhir pemeliharaan (g)

No : berat rata-rata di awal pemeliharaan (g)

t : lama pemeliharaan

Tingkah Laku Uji

Tingkah laku uji ikan selama 14 hari pemeliharaan pasca infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dilakukan dengan mengamati tingkah laku ikan, kebiasaan makan ikan, cara berenang ikan, dan respon terhadap lingkungan, serta interaksi ikan antara satu sama lain.

Analisis Data

Data yang diperoleh ditabulasikan ke dalam Ms. Excel dan dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Pengujian bahan antimikroba (kimia) pada bakteri *Aeromonas hydrophila* secara in vitro dilakukan melalui 3 tahap, yaitu pengujian kirby-bauer, tunggal dan gabungan, serta pengujian kultur bersama pada media *Tryptic soy broth* dengan metode *total plate count* (TPC).

Pengujian tunggal

Berikut ini adalah hasil penngujian tunggal pada obat kimi yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengujian tunggal bahan antimikroba (kimia) dengan metode zona hambat pada media yang ditumbuhi *Aeromonas hydrophila*.

Table 1. Single testing of antimicrobial (chemical) agents using the inhibition zone method on media cultured with *Aeromonas hydrophila*

Bahan Obat Kimia & Dosis	Zona hambat (mm)
Garam Ikan 5 g/L	8,80
Garam Ikan 10 g/L	9,83
Garam Ikan 15 g/L	9,60
Garam Ikan 20 g/L	13,83
Garam Ikan 25 g/L	7,80
Garam Ikan 30 g/L	10,10
Methylene Blue 0,5 mL/L	6,05
Methylene Blue 1,0 mL/L	6,28
Methylene Blue 1,5 mL/L	8,80
Methylene Blue 2,0 mL/L	9,03
Methylene Blue 2,5 mL/L	9,40
Methylene Blue 3,0 mL/L	18,25
Lukastop 0,010 mL/L	7,07
Lukastop 0,013 mL/L	7,38

Berdasarkan hasil di atas menunjukkan bahwa methylene blue 3 mL/L menghasilkan zona hambat sebesar 18,25 mm dan terendah ditunjukkan pada methylene blue 1 mL/L.

Pengujian Kirby-bauer gabungan

Pengujian Kirby-bauer gabungan ialah pengujian yang menggunakan gabungan 2 bahan antimikroba (kimia) yang berbeda, baik dosis dan yang dapat mengurangi penyebaran bakteri *Aeromonas hydrophila* secara in vitro atau pada media tumbuh (TSA). Bakteri yang tumbuh di media tumbuh dihitung zona hambatnya yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengujian gabungan bahan antimikroba (kimia) dengan metode zona hambat pada media yang ditumbuhi *Aeromonas hydrophila*.

Table 2. Combined testing of antimicrobial (chemical) agents using the inhibition zone method on media cultured with *Aeromonas hydrophila*

Gabungan Bahan Obat Kimia & Dosis	Zona Hambat
GI 5 g/L	MB 0,5 mL/L 8,5
	MB 1,0 mL/L 11,0

Gabungan Bahan Obat Kimia & Dosis	Zona Hambat
GI 5 g/L	MB 1,5 mL/L 8,3
	MB 2,0 mL/L 12,9
	MB 2,5 mL/L 12,0
	MB 3,0 mL/L 11
GI 10 g/L	MB 0,5 mL/L 8,5
	MB 1,0 mL/L 8,3
	MB 1,5 mL/L 10,0
	MB 2,0 mL/L 9,8
	MB 2,5 mL/L 8,2
GI 15 g/L	MB 3,0 mL/L 10,0
	MB 0,5 mL/L 8,4
	MB 1,0 mL/L 10,4
	MB 1,5 mL/L 5,8
	MB 2,0 mL/L 7,9
GI 20 g/L	MB 2,5 mL/L 7,0
	MB 3 mL/L 7,4
	MB 0,5 mL/L 7,1
	MB 1,0 mL/L 10,9
	MB 1,5 mL/L L 7,9
GI 25 g/L	MB 2,0 mL/L 14,5
	MB 2,5 mL/L 11,0
	MB 3,0 mL/L 7,0
	MB 0,5 mL/L 9,8
	MB 1,0 mL/L L 8,5
GI 30 g/L	MB 1,5 mL/L L 16,0
	MB 2,0 mL/L 12,5
	MB 2,5 mL/L 9,3
	MB 3,0 mL/L 17,9
LS 0,010	MB 0,5 mL/L 6,9
	MB 1,0 mL/L 7,5
	MB 1,5 mL/L 6,5
	MB 2,0 mL/L 12,2
	MB 2,5 mL/L 6,5
LS 0,013	MB 3,0 mL/L 6,3
	MB 0,5 mL/L L 8,2
	MB 1,0 mL/L 8,6
	MB 1,5 mL/L 8,3
	MB 2,0 mL/L 8,1
LS 0,013	MB 2,5 mL/L 8,7
	MB 3,0 mL/L 9,1
	MB 0,5 mL/L 14,2
	MB 1,0 mL/L 9,8
	MB 1,5 mL/L 9,9
LS 0,013	MB 2,0 mL/L 9,5
	MB 2,5 mL/L 8,1
LS 0,013	MB 3,0 mL/L 10,0

Gabungan Bahan Obat Kimia & Dosis	Zona Hambat
LS 0,010	GI 5,0 g/L 6,9
	GI 5,0 g/L 8,2
	GI 5,0 g/L 8,0
	GI 5,0 g/L 6,0
	GI 5,0 g/L 7,3
LS 0,013	GI 5,0 g/L 7,5
	GI 5,0 g/L 8,6
	GI 5,0 g/L 12,5
	GI 5,0 g/L 6,1
	GI 5,0 g/L 6,9
LS 0,013	GI 5,0 g/L 13,0
	GI 5,0 g/L 7,2

Keterangan:

GI = Garam Ikan
 MB = Methylene Blue
 LS = Lukastop

Berdasarkan hasil di atas menunjukkan bahwa zona hambat terbesar dihasilkan dari kombinasi obat garam ikan 25 g/L dan methylene blue 3 mL/L yaitu 17,9 mm dan terendah dihasilkan pada lukastop 0,010 mL/L dan garam ikan 5 g/L yaitu 6,0 mm.

Pengujian Kultur Bersama

Pengujian kultur bersama ialah pengujian yang bertujuan untuk mengetahui bahan antimikroba (kimia) yang mampu menekan pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* secara in vitro atau pada media TSA. Pengujian akan menghasilkan jumlah koloni bakteri yang nantinya akan dihitung sebagai perbandingan antara bahan antimikroba (kimia) lainnya. Pengujian kultur bersama menggunakan bahan antimikroba (kimia) dengan dosis terbaik dengan metode *total plate count* (TPC) secara in vitro atau media yang ditumbuhi *Aeromona hydrophila* dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 3. Pengujian kultur bersama bahan antimikroba (kimia) dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada media tumbuh TSB menggunakan metode *total plate count* (TPC)

Table 3. Culture testing of antimicrobial (chemical) agents with *Aeromonas hydrophila* in TSB growth medium using the total plate count (TPC) method

Jenis Obat	TPC (CFU/mL)
Lukastop 0,013 mL/L	$8,090 \times 10^9$
Garam ikan 20 g/L	$5,215 \times 10^9$
Methylene blue 3,0 mL/L	$5,197 \times 10^9$

Berdasarkan hasil pada Tabel 3 didapatkan bahwa hasil TPC terendah yang menunjukkan penurunan jumlah bakteri AHA yaitu pada *methylene blue* 3,0 μ L/mL dengan jumlah $5,197 \times 10^9$ CFU/mL.

Pengujian secara In vivo

Hasil uji in vivo dapat dilihat pada Tabel 4. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perendaman MB dosis 3 mL/L menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* secara signifikan.

Tabel 4. Tingkah laku dan gejala klinis benih ikan nila
Table 4. Behavior and clinical symptoms of Nile Tilapia seed

Pasca Infeksi Bakteri	Tingkah Laku	Gejala Klinis	Kematian Ikan
Hari ke 0 - 2	Normal	Tubuh ikan terlihat normal dan tidak memiliki luka	-
Pasca perlakuan pengobatan	Tingkah Laku	Gejala Klinis	Kematian Ikan
Hari ke-3	Ikan terlihat lemas	Tubuh ikan terlihat normal	1 ekor
Hari ke-4	Berenang tidak terlalu aktif/lemas	Ikan memiliki luka dibagian tubuh dan ekor	
Hari ke 5 - 6	Ikan berdiam di sudut akuarium	Tubuh ikan pucat	1 ekor
Hari ke 7 - 8	Berenang normal namun nafsu makan berkurang	beberapa tubuh ikan pucat dan memiliki luka ditubuh	-
Hari ke-9	Ikan berenang ke permukaan air	masih memiliki luka	
Hari ke-10	Ikan berkumpul di dekat aerasi	Beberapa ikan memiliki luka dan gripis di sirip	1 ekor
Hari ke-11	Ikan aktif berenang	Tubuh ikan terlihat normal dan beberapa ikan memiliki luka	-
Hari ke 12-14	Ikan berenang normal dan nafsu makan membaik	Pergerakan ikan normal,	1 ekor

Hasil data diatas menunjukan bahwa selama pasca infeksi bakteri terjadi kematian 2 ekor ikan sebelum dilakukannya pengobatan *methylene blue* melalui metode perendaman. Setelah pasca perlakuan pengobatan, terjadi kematian 2 ekor ikan selama

pemeliharaan. Tingkah laku ikan selama pemeliharaan yaitu normal di awal pemeliharaan, namun setelah penginfeksian tingkah laku ikan tidak normal dan gejala klinis pada ikan juga tidak normal dengan kesehatan ikan yang menurun.

Setelah pasca pengobatan tingkah laku ikan mulai normal dan gejala klinis masih tidak normal, namun tidak separah sebelum dilakukannya pengobatan.

Tingkat Nafsu Makan

Tingkat nafsu makan benih ikan nila pasca infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan pasca pengobatan disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Tingkat nafsu makan benih ikan nila
Table 5. Appetite level of Nile Tilapia seed

Pasca Infeksi Bakteri	Nafsu Makan	Jumlah konsumsi pakan (g)
Hari ke 0-2	++++	10
Pasca Perlakuan pengobatan	Nafsu Makan	Jumlah konsumsi pakan (g)
Hari ke 3-4	+++	9
Hari ke 5-6	++	6
Hari ke 7-9	+++	10
Hari ke 10-11	+++	14
Hari ke 12-14	+++	20

Keterangan

++++ = Sangat baik

+++ = Baik

++ = Kurang

+ = Buruk

Hasil data diatas menunjukkan bahwa tingkat nafsu makan dan jumlah konsumsi pakan pada pasca infeksi bakteri dan pasca perlakuan pengobatan berbeda. Pada pasca infeksi bakteri nafsu makan ikan dan jumlah konsumsi pakan menurun selama pemeliharaan, sedangkan pasca perlakuan pengobatan nafsu makan dan jumlah konsumsi pakan meningkat. Berikut adalah Tabel 6 yang menunjukkan tingkah laku, gejala klinis, nafsu makan dan jumlah konsumsi pakan (JKP) pada perlakuan kontrol.

Tabel 6. Perlakuan kontrol benih ikan nila
Table 6. Control treatment of Nile Tilapia Seed

Hari ke-	Pasca Infeksi Bakteri			
	Tingkah Laku	Gejala Klinis	Nafsu Makan	JKP (g)
1	Ikan Berenang aktif	-	-	-

2	Ikan berenang pasif dan tidak bergerombol	Nafsu makan menurun	+	1
3	Ikan berenang pasif,	Terdapat kemerahan	+	1
4	Ikan berenang pasif, dan tidak bergerombol	-	+	1
5	Ikan berenang pasif, dan berada di dasar	-	+	3
6	Ikan berenang pasif, dan berada di permukaan	-	+	1
7	Ikan berenang pasif dan respon berkurang	-	+	3
8	Ikan berenang pasif, dan berada di permukaan	Terdapat ulcer	+	4
9	Ikan berenang pasif, dan berenang di permukaan	-	+	5
10	Ikan berenang pasif, dan respon ikan kurang	-	+	6
11	Ikan berenang pasif	-	+	5

12	Ikan berenang pasif	-	+	5
13	Ikan berenang pasif, berenang di permukaan	-	+	5
14	Ikan berenang pasif	Terdapat ulcer, kemerahan, sirip rontok	+	5

Hasil data diatas menunjukkan bahwa ikan kontrol selama pemeliharaan yaitu normal di awal pemeliharaan, namun setelah diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* tingkah laku ikan tidak normal dan kesehatan ikan yang menurun. Nafsu makan ikan serja jumlah konsumsi pakan mengalami penurunan selama pemeliharaan. Kelangsungan hidup benih ikan nila disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Kelangsungan hidup benih ikan nila pasca infeksi bakteri dan pengobatan
Table 7. Survival rate of Nile Tilapia seed after bacterial infection and treatment

Kelangsungan hidup	Pasca infeksi bakteri	Pasca perlakuan pengobatan
Survival rate (%)	90	80
Mortality Rate (%)	10	20
LPH (%/hari)	0,04	0,08

Hasil data diatas menunjukkan bahwa selama pemeliharaan 1 minggu pasca infeksi dan 1 minggu pasca perlakuan pengobatan menunjukkan data survival Rate (%) yaitu 80 %, mortality Rate (%) yaitu 20 % dan LPH 0,08 %. Berikut ini adalah Tabel 8 yang menunjukkan data ikan kontrol.

Tabel 8. Kelangsungan hidup ikan kontrol
Table 8. Survival rate of fish control

Kelangsungan hidup	Kontrol +	Kontrol -
Survival rate (%)	15	100
Mortality Rate (%)	85	0
LPH (%/hari)	0,01	0,06

Hasil data diatas menunjukkan bahwa selama pemeliharaan 2 minggu pasca infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan kontrol yang tidak diberi perlakuan pengobatan menunjukkan survival rate 15 %, mortality rate (%) yaitu 85 % dan LPH 0,01 %. Perlakuan kontrol negative tidak ditemukan ikan yang mati.

Pembahasan

Analisis secara umum mengenai pengujian bahan antimikroba (kimia) pada bakteri *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro* didapatkan bahwa pada pengujian tunggal dengan metode kirby-bauer didapatkan hasil terbaik, yaitu garam ikan dengan dosis 20 g/L dengan hasil zona hambat yang didapatkan ialah 17,85 mm. Pada pengujian bersama didapatkan hasil terbaik pada methylene blue 20 g/L dikarenakan mampu menghasilkan jumlah koloni terendah yaitu 5.197×10^9 CFU/mL.

Obat-obatan yang digunakan dalam pengujian bahan antimikroba memiliki peranan yang sangat penting dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen, khususnya *Aeromonas hydrophila*. Garam ikan dan methylene blue yang kami gunakan merupakan obat umum yang beredar di pasaran dan mudah didapatkan. Methylene blue merupakan obat-obatan yang banyak digunakan pembudidaya dan para penghobi untuk mengobati ikan yang sakit. Methylene blue memiliki beberapa fungsi, diantaranya sebagai pencegah dan pengobatan pada ikan sakit, penggunaan dalam pembiakan atau tahap inkubasi telur, dan pemulihan dari stress. Garam ikan ialah campuran garam yang digunakan dalam akuakultur untuk memberikan salinitas yang sesuai dengan tempat tinggal ikan, sebagai pencegahan dan pengobatan penyakit, dan stimulasi produksi lendir dan membran sel.

Methylene blue dan garam ikan diketahui memiliki peran dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Methylene blue, sebagai pewarna dan antimikroba, dapat berinteraksi dengan struktur sel bakteri dan menghambat proses respirasi serta pertumbuhannya (Smith *et al.* 2022). Garam ikan, khususnya yang mengandung natrium klorida, memiliki sifat antimikroba yang dapat merusak membran sel bakteri dan menghambat aktivitas enzim vital (Garcia *et al.* 2021). Selain itu, garam ikan, memiliki sifat osmotik yang dapat merusak dinding sel bakteri, mengakibatkan kehilangan air dan zat esensial, serta menghambat fungsi enzim seluler (Jones *et al.* 2020).

Methylene blue yang diberikan mampu meningkatkan daya tahan tubuh ikan nila sehingga menyebabkan tidak bertambahnya bakteri yang menyebabkan daya tahan tubuh ikan nila menurun dan mampu menyembuhkan ikan nila yang terserang penyakit *Aeromonas hydrophila* (Rustikawati 2011). Pemberian obat *methylene blue* dengan dosis 15 mL menunjukkan hasil terbaik dalam meningkatkan laju pertumbuhan ikan nila yang terinfeksi penyakit white spot, yaitu mencapai 132,00% (Sulistiawati et al 2023). Analisis menunjukan bahwa dosis obat *Methylene blue* dengan dosis 3 g/L atau 3 mL/L air berpengaruh nyata terhadap tingkat *Survival Rate* (SR %), *Mortality Rate* (%), Laju pertumbuhan spesifik (SGR). Tingginya nilai rata-rata pertumbuhan ikan nila pada ikan selama pemeliharaan dengan dosis obat *Methylene blue* 3 ppt atau 3 mL/L dengan berat rata-rata 9,37 g.

Obat-obatan yang digunakan dalam pengujian bahan antimikroba (kimia) memainkan peranan yang sangat penting dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*. Selain itu pemberian obat dengan dosis 3 mL/L air diduga mampu meningkatkan daya tahan tubuh pada benih ikan nila sehingga memaksimalkan kerja metabolisme yang berdampak pada kemampuan ikan nila dalam memanfaatkan makanan yang diberikan (Widyatmoko et al. 2009).

KESIMPULAN

Hasil pengujian in vitro pada pengujian tunggal yang terbaik didapatkan pada perlakuan *methylene blue* 3 mL/L dengan zona hambat sebesar 18,25 mm dan jumlah bakteri AHA terendah yaitu $5,197 \times 10^9$ CFU/mL. Hasil pengujian in vitro pada pengujian gabungan yang terbaik didapatkan pada perlakuan garam ikan 25 g/L dan *methylene blue* 3 mL/L dengan zona hambat 17,9 mm. Hasil pengujian in vivo pengobatan dengan *methylene blue* 3 mL/L, menghasilkan nilai SR 80% dan mampu membantu penyembuhan pasca infeksi serta meningkatkan nafsu makan ikan. Rekomendasi penelitian ini adalah perlakuan *methylene blue* 3 mL/L untuk dapat diterapkan pada para pembudidaya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih kepada Laboratorium Kesehatan dan Lingkungan, Program Studi Teknologi dan Manajemen Pembenihan Ikan, Sekolah Vokasi, IPB University yang telah memberikan izin menggunakan fasilitas laboratorium untuk pengerjaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas MA, Batubara AS, & Muchlisin ZA. (2021). Effect of dietary protein level on growth, food utilization, food conversion and survival rate of giant trevally (*Caranx ignobilis*). F1000Research. 1-8.
- Astria Q, Nuryati S, Nirmala K, Alimuddin A. 2017. Effectiveness of ambon banana stem juice as immunostimulatory against *Aeromonas hydrophila* infections in catfish *Clarias gariepinus*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 16(2): 154-163.
- Barlow, J. 1984. Mortality estimation: biased results from unbiased ages. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41: 1843–1847.
- Garcia RM, Patel SK. 2021. Fish salt as a potential antimicrobial agent against *Aeromonas hydrophila* in aquaculture. *Aquaculture Advances*. 15(4): 220-235.
- Jones ER, Patel SK. 2020. Synergistic antibacterial effects of *methylene blue* and fish salt against *Aeromonas hydrophila*: A mechanistic study *Aquaculture Research*. 52(8): 3256-3265.
- Mangunwardoyo W, Ismayasari R, Riani E. 2016. Uji patogenisitas dan virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) melalui postulat Koch. *Jurnal riset akuakultur*. 5(2): 145-255.
- Nimrat S, Boonthai T, & Vuthiphandchai V. 2011. Effect of probiotic form, composition of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae. *Animal Feed Science and Technology*. 169: 244-258. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.07.003.

- Nur ME, Zariah Z. 2017. Isolasi DNA genomik *Vibrio alginolyticus* untuk pembuatan vaksin perkombinan. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*. 8(2), 177-179.
- Perez A. 2017. No Title. *BMC Public Health*, 5(1), 1–8.
- Reynolds J, & Mark F. 2005. Counting bacteria. Richard College.
- Rustikawati I. 2011. Peningkatan imunitas ikan nila terhadap serangan white spot. *Indian Journal of Applied Research*. 1(1): 18–30.
- Sinubu WV, Tumbol RA, Undap SL, Manoppo H, & Kreckhoff RL. 2022. Identifikasi bakteri patogen *Aeromonas* sp. pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di Desa Matungkas, Kecamatan Dimembe, Kabupaten Minahasa Utara. *e-Journal Budidaya Perairan*, 10(2), 109-120.
- Smith AB, & Jones CD. 2022. The antimicrobial properties of methylene blue: A comprehensive review. *Journal of Microbial Research*, 30(2), 150-165.
- Sulistiani S, Surianti S, & Putri RS. 2023. Pengaruh dosis obat methylene blue terhadap kelangsungan hidup ikan nila (*Oreochromis niloticus*) Yang Terserang Penyakit White Spot. *Jurnal Sains dan Teknologi Perikanan*, 3(2), 77-85.
- Widyatmoko, Hefni E, & Niken TMP. 2019. Pertumbuhan dan sintasan ikan nila, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) pada sistem akuaponik dengan padat tanaman vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) yang berbeda. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 19(1), 157–166.

