

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Negara Indonesia merupakan Negara dengan jumlah 17.504 pulau dan telah diakui dunia internasional pada konvensi hukum laut PBB ketiga, dimana wilayah seluruh lautan Indonesia menurut Undang-Undang RI No. 17 Tahun 1985 menjadi 5,9 juta km² yang terdiri dari perairan territorial seluas 3,2 juta km² dan perairan Zona Ekonomi Eksklusif seluas 2,7 juta km². Wilayah perairan Indonesia yang luas menjadikan Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang melimpah, sehingga pada bidang perikanan menjadikan faktor penting dalam perekonomian Indonesia. Kekayaan alam hayati yang melimpah terlihat dari berbagai species ikan yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi (PetSoede *et al.*, 1999).

Salah satu species ikan yang berpotensi sebagai komoditas ekspor yang sangat menjanjikan yaitu ikan sidat (*Anguilla bicolor*). Kandungan gizi yang terdapat pada ikan sidat diantaranya vitamin A, B1, B2, dan kandungan seng yang lebih tinggi dibandingkan dengan susu sapi. Selain itu juga ikan sidat mengandung berbagai asam lemak tak jenuh yang tinggi dibandingkan kandungan yang terdapat di hewan lainnya (Suitha, & Akhmad, 2008). Tingginya kandungan gizi yang terdapat pada ikan sidat membuat masyarakat banyak memanfaatkan ikan sidat sebagai bahan olahan makanan. Terutama pada Negara Jepang, menurut Affandi & Suhenda (2003) Jepang merupakan salah satu negara yang memanfaatkan ikan sidat sebagai kebutuhan konsumsi bagi warganya, sehingga nilai komersial ikan sidat di Jepang sangat tinggi. Terlihat dari permintaan ikan sidat pada pasar Jepang mencapai 200.000 ton/tahun, sedangkan pada pasar Amerika mencapai 100.000 ton/tahun (Noviani, 2013). Selain Jepang dan Amerika, telah dilaporkan oleh Restu (2006) yang menyatakan bahwa permintaan pasar di luar negeri masih menjanjikan selain dari pasar Jepang, terdapat juga permintaan pasar di Taiwan mencapai 52.000 ton/tahun, di Jerman, Belanda, China, dan Denmark.

Wilayah yang dijadikan sebagai produksi tangkap ikan sidat di Indonesia mengalami penurunan secara drastis dari tahun ke tahun.

Leni Silfan⁸, 2013

ANALISIS METAGENOMIK BAKTERI PADA USUS IKAN SIDAT (*Anguilla sp.*) FASE GLASS EEL DAN ELVER

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

Terlihat pada hasil tangkap ikan sidat pada tahun 2000 mencapai 4.553 ton, namun pada tahun 2010 mengalami penurunan secara drastis menjadi 1.149 ton ikan sidat. Hal ini disebabkan populasi ikan sidat terganggu karena adanya penangkapan secara besar-besaran pada masa migrasi, dan perubahan ekosistem yang diakibatkan dari limbah, dan pengembangan *hydropower* (Noviani, 2013). Oleh sebab itu, masyarakat melakukan pemeliharaan pada ikan sidat untuk menaikkan hasil dari tangkap ikan.

Secara umum masyarakat memelihara ikan sidat dengan menangkap ikan sidat pada fase *glass eel* di laut, kemudian dipelihara di kolam. Namun, hasil produk budidaya ikan sidat masih di bawah jumlah permintaan pasar dunia, dengan produk yang dihasilkan 4% dari seluruh jumlah permintaan pasar dunia (Noviani, 2013). Hal ini disebabkan adanya kematian yang tinggi saat fase *glass eel* mencapai 70-80%, sehingga pemeliharaan pada fase *glass eel* merupakan fase yang sangat sulit dengan tingkat kelangsungan hidup sekitar 30-50% (Setianto, 2015).

Pemeliharaan ikan sidat pada masa krisis terjadi pada masa pemeliharaan benih (*glass eel – elver*) hasil tangkapan dari alam (Affandi & Riani, 1995). Hal ini akan terjadi perubahan kondisi lingkungan dari alam kemudian berpindah ke kolam budidaya. Menurut Afriyanto & Evi (1992) kondisi lingkungan yang kurang menunjang untuk ikan mengakibatkan ikan mudah stres, kemudian ikan yang stres akan mengalami penurunan kemampuan dalam mempertahankan diri dari serangan penyakit. Penyakit akan berkembang pada kolam pemeliharaan dan menimbulkan mortalitas pada ikan, salah satunya yaitu akibat penyakit menular yang berkembang pada kolam pemeliharaan yang disebabkan adanya aktivitas bakteri patogen (Lestari, Budiharjo & Pangastuti, 2016). Perbedaan makanan juga berpengaruh terhadap ikan untuk tumbuh dan berkembang. Pemeliharaan ikan sidat dari fase *glass eel* hingga *elver* menggunakan pakan buatan yang berbentuk pasta dengan kandungan protein sebesar 45% (Saputra, 2016), sementara di alam menurut Jacoby, Harrison & Gollock (2014) selama pertumbuhan ikan sidat diperkirakan memakan ikan kecil, *crustacea*, dan *molusca*. Perbedaan makanan inilah akan mengakibatkan perubahan populasi bakteri di dalam usus ikan dan akan berpengaruh terhadap kesehatan ikan. Cantas *et al.* (2012) menyatakan bahwa akibat perbedaan

Leni Silfan⁸, 2013

ANALISIS METAGENOMIK BAKTERI PADA USUS IKAN SIDAT (*Anguilla sp.*) FASE GLASS EEL DAN ELVER

Universitas Pendidikan Indonesia

| repository.upi.edu

perpustakaan.upi.edu

makanan akan terjadi perbedaan populasi bakteri pada usus ikan. Menurut Vadstein *et al.* (2013) interaksi antara ikan dan mikrobiota yang terdapat di kolam budidaya menjadikan faktor kunci dalam menjelaskan kurangnya kesehatan dan pertumbuhan ikan.

Komunitas mikrobiota pada hewan akuatik memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan hidup hewan, karena mikrobiota usus berperan aktif dalam metabolisme nutrisi, peningkatan sistem kekebalan tubuh dan penghambatan patogen potensial (Nayak, 2010). Mikroba usus yang terdapat pada ikan juga bersifat *fluid* (tidak pasti) yang bergantung pada lingkungan dan sensitif terhadap perubahan pola makan ikan (RingØ *et al.*, 2016). Hennersdorf *et al.* (2016) menyatakan bahwa kondisi lingkungan serta pemberian makanan yang berbeda berpengaruh terhadap distribusi komunitas mikrobiota yang terdapat pada usus Ikan. Menurut Guarner & Malagelada (2003) populasi bakteri pada usus manusia konstan sepanjang waktu, tetapi akan mengalami perubahan, jika manusia melakukan perubahan gaya hidup, diet, dan usia juga mempengaruhi populasi bakteri pada usus manusia.

Mikrobiota pada sistem pencernaan ikan sangat beragam jenis dan jumlahnya sangat melimpah. Identifikasi komunitas bakteri yang terdapat pada ikan dapat dilakukan dengan beberapa pendekatan. Beberapa peneliti menyelidiki jenis bakteri yang terdapat di usus ikan sidat dengan menggunakan teknik kultur mikrobiologi. Menurut Lestari, Budiharjo, & Pangastuti (2016) menyatakan bahwa di dalam usus ikan terdapat mikrobiota yang berpotensi sebagai probiotik diantaranya beberapa bakteri dari Proteobacteria, Firmicutes, dan Actinobacteria. Jenis mikroba yang dapat berkembang pada medium umum dengan menggunakan metode dengan teknik kultur mikrobiologi menghasilkan jumlah yang sedikit, sehingga jenis bakteri yang teridentifikasi memiliki jumlah *species* yang sedikit. Torsvik & Ovreas (2002) menyatakan bahwa di dalam tanah sekitar 0,1% - 1% bakteri yang mudah dikultur pada media umum. Bakteri yang tidak dapat tumbuh pada medium umum disebabkan ketidakjelasan aspek lingkungan yang tidak direplikasi dengan benar pada medium tumbuh seperti halnya nutrisi, pH, kondisi osmotik, suhu, dan lain sebagainya sebagai faktor pertumbuhan bakteri (Stewart, 2012). Kaeberlein, Lewis, & Epstein

Leni Silfan8, 2013

ANALISIS METAGENOMIK BAKTERI PADA USUS IKAN SIDAT (*Anguilla sp.*) FASE GLASS EEL DAN ELVER

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

(2002) dalam penelitiannya mencoba mendesain ruang difusi untuk mengkultur bakteri dalam ruang semipermeable dimana sel-sel tidak dapat melewati penghalang membran, tetapi nutrisi dan faktor pertumbuhan dari lingkungan dapat masuk, bakteri diisolasi dari sedimen laut kemudian diinkubasi dalam akuarium air laut yang terdapat hamparan pasir, mikrokoloni bakteri yang tumbuh dengan menggunakan metode ini sebesar 40%. Namun, Teknik kultur mikrobiologi tidak dapat mencapai 100% bakteri yang tumbuh dalam medium. Oleh sebab itu, perlu dilakukan analisis yang mampu mengidentifikasi bakteri yang tidak dapat dikultur.

Saat ini telah berkembang suatu metode yang dapat menggambarkan kenekaragaman mikroba jauh lebih banyak daripada menggunakan kultur bakteri yaitu metagenomik (Handelsman, 2004). Analisis dengan menggunakan metagenomik memberikan data yang lebih banyak dibandingkan dengan menggunakan teknik kultur, sehingga komunitas bakteri yang terdapat pada usus ikan dapat teridentifikasi secara keseluruhan (Sabree, Rondon, & Handelsman, 2009). Tahapan analisis metagenomik dimulai dengan melakukan isolasi DNA bakteri dari sampel lingkungan misalnya pada air, tanah dan usus hewan, kemudian dilakukan amplifikasi segmen DNA. Primer PCR yang spesifik untuk bakteri umumnya dengan menggunakan gen 16s rRNA, karena 16s RNA memiliki daerah yang *conserved* (lestari) yang ada pada semua bakteri. Daerah yang lestari secara umumnya berkorelasi sama (Lau *et al.*, 2002). Metode dalam analisis metagenomik salah satunya dengan menggunakan metode konvensional. Metode ini dimulai dengan melakukan isolasi DNA bakteri dari sampel lingkungan misalnya pada air, tanah dan usus hewan, kemudian dilakukan amplifikasi segmen DNA. Primer PCR yang spesifik untuk bakteri umumnya dengan menggunakan gen 16s rRNA, karena 16s RNA memiliki daerah yang konservatif (lestari) yang ada pada semua bakteri. Daerah yang lestari secara umumnya berkorelasi sama (Lau, *et al.*, 2002). Setelah itu, dilanjutkan dengan menyisipkan urutan DNA sampel ke dalam vektor atau disebut juga dengan tahap ligasi. DNA yang telah disisipkan kemudian ditransformasi ke sel kompeten dan dilanjutkan dengan sekuensing, sekuens DNA yang telah didapatkan dapat di analisis lebih jauh (Hidayat *et al.*, 2012).

Leni Silfan⁸, 2013

ANALISIS METAGENOMIK BAKTERI PADA USUS IKAN SIDAT (*Anguilla sp.*) FASE GLASS EEL DAN ELVER

Universitas Pendidikan Indonesia

| repository.upi.edu

perpustakaan.upi.edu

Analisis metagenomik ini memberikan pemahaman atau penjelasan lebih banyak mengenai mikrobiota yang tidak dapat dikultur dan wawasan mengenai kelompok mikrobiota yang tidak diketahui sebelumnya (Handelsman, 2004). Beberapa peneliti mengidentifikasi komunitas bakteri pada berbagai jenis ikan dengan menggunakan analisis metagenomik. Diéguez *et al.* (2014) mengungkapkan bahwa pada mukosa ikan *European eel* (*Anguilla anguilla*) yang diambil pada tiga lokasi (Albufera de Valencia, Ebro Delta, dan Cabanes), ikan sidat budidaya yang sebelumnya divaksinasi terhadap *Vibrio vulnificus* biotype 2, dan *glass eel* dipelihara di tangki air tawar, pada ikan ini ditemukan organisme dominan yaitu *Gammaproteobacteria* sekitar 30% - 70%. *Gammaproteobacteria* yang ditemukan melimpah diantaranya *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio*, dan *Aeromonas*. Beberapa jenis *Betaproteobacteria* juga ditemukan diantaranya *Comamonas*, dan *Achromobacter*. *Betaproteobacteria* ditemukan pada ikan sekitar 2,6% - 26% dan pada jenis *Alphaproteobacteria* sekitar 5% - 24%. Namun pada ikan sidat jenis *Anguilla* sp. pada fase *glass eel* dan *elver* belum ada penjelasan mengenai keanekaragaman bakteri usus. Oleh sebab itu, peneliti tertarik untuk menganalisis metagenomik bakteri usus *Anguilla bicolor* pada fase *glass eel* hasil tangkapan dan fase *elver* yang diberi pakan komersil dengan menggunakan analisis metagenomik.

Dilakukan dengan pengambilan usus *Anguilla* sp. fase *glass eel* hasil tangkapan di Tasikmalaya dan *elver* hasil pemeliharaan di Universitas Pendidikan Indonesia. Isolasi DNA bakteri total secara langsung pada usus ikan sidat, tanpa melalui tahap kultivasi mikroorganisme, kemudian PCR 16s rRNA, kloning, transformasi, isolasi plasmid, dan sekuensing untuk mengidentifikasi bakteri yang ada di usus ikan sidat.

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimanakah keragaman populasi bakteri yang terdapat pada usus ikan sidat fase *glass eel* hasil tangkapan dan *elver* yang diberi pakan komersil dengan analisis metagenomik?

Leni Silfan8, 2013

ANALISIS METAGENOMIK BAKTERI PADA USUS IKAN SIDAT (*Anguilla* sp.) FASE GLASS EEL DAN ELVER

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

1.3. Pertanyaan Penelitian

- 1.3.1. Terdapat beberapa pertanyaan penelitian yang akan dikemukakan berdasarkan rumusan masalah yaitu:
- 1.3.2. Bagaimana kemurnian dan konsentrasi DNA bakteri pada usus ikan sidat fase *glass eel* dan *elver*?
- 1.3.3. Bagaimana hasil amplifikasi gen 16s rRNA pada DNA bakteri usus ikan sidat fase *glass eel* dan *elver*?
- 1.3.4. Bagaimana pembentukan pustaka metagenom dari DNA bakteri usus pada ikan sidat fase *glass eel* dan *elver*?
- 1.3.5. Bagaimana identifikasi bakteri berdasarkan sikuen DNA yang ditunjukkan dari hasil blast NCBI, EzTaxon dan pohon filogenetik?
- 1.3.6. Bagaimana keanekaragaman dan perbedaan komunitas bakteri usus pada ikan sidat fase *glass eel* hasil tangkapan dan fase *elver* yang diberi pakan komersil?

1.4. Batasan Masalah

Terdapat beberapa batasan masalah yang akan membatasi penelitian yaitu:

- 1.4.1. Ikan sidat fase *glass eel* sebagai populasi ikan liar yang diambil dari Penangkap Sidat Power Indonesia di Kec. Cisayong Kab. Tasikmalaya, dan ikan sidat fase *elver* sebagai populasi ikan budidaya diambil di budidaya Universitas Pendidikan Indonesia.
- 1.4.2. Primer penanda untuk analisis metagenomik yang digunakan yaitu 16s rRNA universal.

1.5. Tujuan

Menganalisis keanekaragaman taksonomi bakteri usus pada ikan sidat fase *glass eel* hasil tangkapan dan *elver* yang diberi pakan komersil dengan menggunakan metagenomik.

1.6. Manfaat

Manfaat dari hasil penelitian yang dilakukan sebagai berikut:

- 1.6.1. Memberikan gambaran mengenai kelimpahan bakteri usus yang terdapat di ikan sidat.

Leni Silfan⁸, 2013

ANALISIS METAGENOMIK BAKTERI PADA USUS IKAN SIDAT (*Anguilla sp.*) FASE GLASS EEL DAN ELVER

Universitas Pendidikan Indonesia

| repository.upi.edu |

perpustakaan.upi.edu

- 1.6.2. Memberikan informasi mengenai keanekaragaman komunitas bakteri usus pada ikan sidat fase *glass eel* yang hidup di alam dan fase *elver* yang telah diberi pakan komersil.
- 1.6.3. Dapat dijadikan studi pustaka bagi peneliti untuk dapat mengembangkan penelitiannya.

1.7. Struktur Organisasi Skripsi

Penulisan skripsi terdiri dari lima bab yaitu bab 1 menjelaskan mengenai latar belakang masalah pada penelitian, rumusan masalah, batasan masalah penelitian, tujuan dan manfaat dari penelitian. Bab II menjelaskan mengenai teori yang akan mendukung penelitian yaitu menjelaskan tentang ikan sidat (*Anguilla* sp.), mikrobiota usus, Gen 16s rRNA, metagenomik, vektor, dan sekuensing. Bab III menjelaskan metode yang digunakan dan tahapan penelitian yang akan dilakukan diantaranya desain penelitian yang dilakukan, objek dan tempat penelitian, dan prosedur penelitian. Prosedur penelitian ada dua tahap yaitu tahap persiapan dan tahap penelitian. Tahap penelitian meliputi koleksi sampel, isolasi DNA Bakteri usus ikan sidat, uji kuantitatif dan kuantitatif PCR gen 16s rRNA, Elektroforesis, persiapan sel kompeten, ligasi, persiapan transformasi, isolasi plasmid, PCR M13, sekuensing dan analisis. Bab IV menjelaskan mengenai hasil dari penelitian yang telah dilakukan dan dibahas secara detail hasil data yang didapatkan dari penelitian yang telah dilakukan. Data hasil yang didapatkan berupa DNA bakteri usus dan gen target yang menggunakan 16s rRNA, penyisipan DNA ke vektor, transformasi, isolasi plasmid, uji keberhasilan transformasi, sekuensing DNA, analisis DNA, dan komunitas bakteri pada usus ikan sidat fase *glass eel* dan *elver*. Bab V menjelaskan mengenai kesimpulan dan tujuan yang didapatkan dari penelitian yang dilakukan dan merekomendasikan kepada pihak-pihak yang terkait untuk pengembangan penelitian lebih lanjut.

Leni Silfan⁸, 2013

ANALISIS METAGENOMIK BAKTERI PADA USUS IKAN SIDAT (*Anguilla* sp.) FASE GLASS EEL DAN ELVER

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu