

**POTENSI *CELL-FREE SUPERNATANT (CFS) LACTOBACILLUS PLANTARUM*
SEBAGAI ANTIBIOFILM TERHADAP *VIBRIO HARVEYI* PENYEBAB VIBRIOSIS
PADA UDANG**



**ANDI FIKA HAYYINUN RIZKY AMRY
H041201092**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**POTENSI *CELL-FREE SUPERNATANT (CFS) LACTOBACILLUS PLANTARUM*
SEBAGAI ANTIBIOFILM TERHADAP *VIBRIO HARVEYI* PENYEBAB VIBRIOSIS
PADA UDANG**

**ANDI FIKA HAYYINUN RIZKY AMRY
H041201092**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**POTENSI *CELL-FREE SUPERNATANT (CFS) LACTOBACILLUS PLANTARUM*
SEBAGAI ANTIBIOFILM TERHADAP *VIBRIO HARVEYI* PENYEBAB VIBRIOSIS
PADA UDANG**

ANDI FIKA HAYYINUN RIZKY AMRY
H041201092

Skripsi

Diajukan sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Sarjana

Program Studi Biologi

pada

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

SKRIPSI

**POTENSI CELL-FREE SUPERNATANT (CFS) LACTOBACILLUS PLANTARUM
SEBAGAI ANTIBIOFILM TERHADAP VIBRIO HARVEYI PENYEBAB VIBRIOSIS
PADA UDANG**

ANDI FIKA HAYYINUN RIZKY AMRY
H041201092

Skripsi,

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Biologi pada 06 Agustus
2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

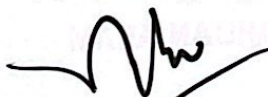
pada



Program Studi Biologi
Departemen Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Tugas Akhir,



Dr. Nur Haedar, S.Si.M.Si
NIP. 196801291997022001

Mengetahui:
Ketua Program Studi,



Dr. Magdalena Litaav, M.Sc.
NIP. 196409291989032002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul: "*Potensi Cell-Free Supernatant (CFS) Lactobacillus plantarum Sebagai Antibiofilm Terhadap Vibrio harveyi Penyebab Vibriosis Pada Udang*" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing Dr. Nur Haedar, S.Si. , M.Si. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 06 Agustus 2024



Andi Fika Hayyinun Rizky Amry
H041201092

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur senantiasa penulis ucapkan keharidat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, hidayah dan nikmat kesehatan, sehingga skripsi yang berjudul: **Potensi *Cell-Free Supernatant (CFS) Lactobacillus plantarum* Sebagai Antibiofilm Terhadap *Vibrio harveyi* Penyebab Vibriosis Pada Udang**, dapat diselesaikan dengan baik. Karya ilmiah ini merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan sarjana (S1) di Program Studi Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Hasanuddin. Shalawat dan salam terucap semoga tersampaikan kepada junjungan Nabi Muhammad SAW yang telah membawa cahaya terang dan petunjuk bagi umat manusia.

Dalam kegiatan penelitian dan penyusunan skripsi ini, penulis banyaknya menghadapi tantangan dan hambatan, dari awal rencana penelitian hingga penyusunan skripsi ini. Namun berkat rahmat Tuhan YME penulis mampu melaluinya dengan segala keterbatasan dan kesabaran, olehnya itu kemungkinan dalam penulisan skripsi ini terdapat kekurangan-kekurangan yang tidak disengaja ataupun tidak disadari, maka penulis mengharapkan kritikan dan arahan yang sifatnya konstruktif, sehingga karya ilmiah ini dapat lebih disempurkan. Pada kesempatan ini dengan segala keikhlasan dan kerendahan hati perkenakan penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- Orang tua tercinta, Ibunda Hastuty Mano dan Andi Amry Mattalitti yang telah mendidik, mendoakan, mendukung dan mengusahakan yang terbaik untuk penulis.
- Ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, sekaligus Penasehat Akademik (PA), Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc. atas ilmu dan saran hingga terselesaikannya penelitian ini.
- Dosen pembimbing, Ibu Dr. Nur Haedar, S.Si. , yang telah meluangkan waktu memberikan bimbingan dan arahan dalam penelitian hingga terselesaikannya skripsi ini.
- Tim penguji, Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc. dan Bapak Dr. Eddyman W. Ferial, M.Si yang meluangkan waktu memberikan arahan dan petunjuk dalam pelaksanaan penelitian.
- Ibu Meidistria Tandi Rapak, S.Si., M.Sc yang telah meluangkan waktu untuk memberikan masukan terkait ide penelitian.
- Seluruh Bapak/Ibu dosen Departemen Biologi yang telah mendidik dan men-transfer ilmunya dengan tulus dan sabar kepada penulis selama pendidikan, dan staf admistrasi yang telah melancarkan urusan administrasi.
- Muhammad Yusuf Usman, S.Si selaku pendamping peneliti di Laboratorium HUM-RC (Hasanuddin University Medical Research Center) yang telah membantu dalam proses penelitian ini.
- Sahabat-sahabat saya Ocha, Fahryl dan Dea yang telah banyak mendukung dan membantu saya dalam banyak hal selama proses penelitian ini.

- Teman-teman seperjuangan terutama Fio yang telah kebersamai dalam proses perjalanan perkuliahan hingga proses penelitian, Yunika, Tiwai, Febby, Ara, Indah, Dytha yang telah bersama melalui proses perkuliahan.
- Teman-teman Biologi Angkatan 2020, yang telah memberi warna dalam perjalanan menyelesaikan perkuliahan.

Makassar, 06 Agustus 2024

Andi Fika Hayyinun Rizky A.

ABSTRAK

ANDI FIKA HAYYINUN RIZKY AMRY. **Potensi *Cell-Free Supernatant (CFS) Lactobacillus plantarum* Sebagai Antibiofilm Terhadap *Vibrio harveyi* Penyebab Vibriosis Pada Udang** (dibimbing oleh Nur Haedar)

Latar Belakang. *Vibrio harveyi* dapat terus membentuk biofilm pada permukaan, menunjukkan resistensi terbesar pada pelat beton, plastik, dan baja. Hal ini dapat menyebabkan penyakit *Vibriosis* pada vertebrata dan invertebrata laut, yang dapat mengakibatkan kerugian besar bagi industri akuakultur di seluruh dunia. **Tujuan.** Penelitian ini dilakukan untuk melihat potensi *Lactobacillus plantarum* CFS dalam menghambat pembentukan biofilm oleh bakteri *Vibrio harveyi* penyebab *Vibriosis* pada udang. **Metode.** Pada penelitian ini menggunakan metode *Microtiter Plates* untuk mengidentifikasi faktor-faktor yang diperlukan dalam pembentukan biofilm dan menilai sifat awal dari biofilm seperti toleransi antibiotik dan resistensi terhadap efektor sistem imun. **Hasil.** Hasil yang ditunjukkan bahwa bakteri *Vibrio harveyi* termasuk bakteri pembentuk biofilm yang kuat (*Strong Biofilm Producer*). Pada CFS *Lactobacillus plantarum* dilakukan 3 uji, yaitu uji pencegahan penempelan yang efektif pada konsentrasi 12,5%, pada uji penghambatan-pembentukan memiliki hasil efektif pada konsentrasi 50% sedangkan pada uji penghancuran tidak efektif pada ketiga konsentrasi. **Kesimpulan.** *Vibrio harveyi* merupakan bakteri pembentuk biofilm yang kuat. *Cell-Free Supernatant Lactobacillus plantarum* memiliki aktivitas pencegahan penempelan biofilm dan penghambatan pembentukan biofilm, namun tidak efektif pada aktivitas penghancuran biofilm.

Kata Kunci: Vibrio harveyi, biofilm, microplates, CFS Lactobacillus plantarum

ABSTRACT

ANDI FIKA HAYYINUN RIZKY AMRY. **Potential of Cell-Free Supernatant (CFS) of *Lactobacillus plantarum* as an antibiofilm against *Vibrio harveyi* which causes vibriosis in shrimp** (Supervised by Nur Haedar)

Background. *Vibrio harveyi* can continuously form biofilms on surfaces, showing the greatest resistance to concrete, plastic and steel plates. This can lead to Vibriosis disease in marine vertebrates and invertebrates, which can result in huge losses to the aquaculture industry worldwide. **Objective.** This study was conducted to see the potential of *Lactobacillus plantarum* CFS in inhibiting biofilm formation by *Vibrio harveyi* bacteria that cause Vibriosis in shrimp. **Methods.** This study used the microtiter Plates method to identify factors required for biofilm formation and assess the initial properties of biofilms, such as antibiotic tolerance and resistance to immune system effectors. **Results.** The results showed that *Vibrio harveyi* was a strong biofilm producer. In CFS *Lactobacillus plantarum*, 3 tests were carried out, namely the effective attachment prevention test at a concentration of 12,5%, the inhibition-formation test had effective results at a concentration of 50% and the destruction test was not effective at all three concentrations. **Conclusion.** *Vibrio harveyi* is a strong biofilm-forming bacterium. Cell-Free Supernatant *Lactobacillus plantarum* has the activity of preventing biofilm attachment and inhibiting biofilm formation, but is not effective in biofilm destruction activity.

Key Words: *Vibrio harveyi*, *biofilm*, *microplates*, *CFS Lactobacillus plantarum*

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	vi
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan dan Manfaat	3
BAB II. METODE PENELITIAN	4
2.1 Alat dan Bahan	4
2.2 Tahapan Penelitian	4
2.2.1 Sterilisasi Alat	4
2.2.2 Pembuatan Media	5
2.2.3 Peremajaan Isolat	5
2.2.4 Pembuatan <i>Cell-Free Supernatant</i> (CFS)	5
2.2.5 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji	5
2.2.6 Pembuatan Kelompok Kontrol	6
2.2.7 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm	6
2.2.8 Uji Aktivitas Antibiofilm	7
2.2.8.1 Uji Pencegahan Penempelan Biofilm	7
2.2.8.2 Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm	7
2.2.8.3 Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm	8
2.3 Analisis dan Interpretasi Data Penelitian	8
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN	9
3.1 Pembentukan Biofilm <i>Vibrio harveyi</i>	9

	x
3.2 Aktivitas Antibiofilm <i>Cell-Free Supernatant</i> (CFS) <i>Lactobacillus plantarum</i> Terhadap <i>Vibrio harveyi</i>	12
3.2.1 Uji Pencegahan Penempelan Biofilm <i>Vibrio harveyi</i>	13
3.2.2 Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm <i>Vibrio harveyi</i>	16
3.3.3 Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm <i>Vibrio harveyi</i>	18
BAB IV KESIMPULAN.....	21
4.1 Kesimpulan	21
4.2 Saran	21
DAFTAR PUSTAKA.....	22
LAMPIRAN	26

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Interpretasi nilai OD dan kekuatan pembentukan biofilm	6
2. Nilai OD dan hasil pengkategorian biofilm	11

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Hasil pengamatan sel bakteri <i>Vibrio harveyi</i> dibawah mikroskop dengan pewarnaan gram.....	9
2. Hasil uji deteksi pembentukan biofilm <i>Vibrio harveyi</i> pada <i>microplate</i>	10
3. Hasil pengamatan sel bakteri <i>Lactobacillus plantarum</i> dibawah mikroskop dengan pewarnaan gram	12
4. Hasil OD uji pencegahan penempelan biofilm <i>Vibrio harveyi</i>	14
5. Persentase aktivitas pencegahan penempelan biofilm <i>Vibrio harveyi</i>	15
6. Hasil OD uji penghambatan pembentukan biofilm <i>Vibrio harveyi</i>	16
7. Persentase aktivitas penghambatan pembentukan biofilm <i>Vibrio harveyi</i> .	17
8. Hasil OD uji penghancuran biofilm <i>Vibrio harveyi</i>	18
9. Persentase aktivitas penghancuran biofilm <i>Vibrio harveyi</i>	19

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	Halaman
1. Medium Pertumbuhan Yang Digunakan Pada Penelitian.....	26
2. Proses Pembuatan <i>Cell-Free Supernatant</i> (CFS) <i>L. plantarum</i>	27
3. Dokumentasi kegiatan penelitian	28
4. Gambaran Uji Deteksi Pembentukan Biofilm pada <i>Microplate</i>	29
5. Gambaran Uji Aktivitas Antibiofilm pada <i>Microplate</i>	30
6. Hasil Uji Aktivitas Pencegahan Penempelan Biofilm pada <i>Microplate</i>	31
7. Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Biofilm pada <i>Microplate</i> .	32
8. Hasil Uji Aktivitas Penghancuran Biofilm pada <i>Microplate</i>	33
9. Data Hasil Uji Antibiofilm.....	34

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Saat ini belum banyak diketahui bagaimana kehidupan biofilm berkontribusi terhadap virulensi patogen *Vibrio* pada organisme laut, berbeda dengan penyakit pada manusia, strain *Vibrio harveyi* merupakan patogen laut yang menginfeksi berbagai macam vertebrata dan invertebrata laut, menyebabkan lesi kulit, peradangan sistem peredaran darah, dan gastroenteritis. Biofilm adalah komunitas bakteri yang menempel pada permukaan abiotik maupun biotik. Keberadaan biofilm ini memberikan bakteri toleransi terhadap kondisi yang ekstrem dan dapat melindungi mereka dari radiasi *ultraviolet* (UV), kadar garam tinggi, suhu tinggi, tekanan tinggi, kelaparan, antibiotik, dan ancaman lainnya (Yin et al., 2019). Mikroorganisme penyebab penyakit dan yang terurai menjadi biofilm bukanlah sumber mikroba yang baik. Produsen dapat mengalami kerugian finansial dan degradasi pangan akibat sel-sel mikrobiologis yang mengkontaminasi makanan dan bahan mentah selama pemrosesan. *Salmonella enteritidis*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Vibrio*, *Listeria monocytogenes*, dan *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri patogen utama yang harus dikendalikan dalam usaha pengolahan hasil laut. Bakteri patogen bawaan makanan ini sering kali membentuk biofilm pada permukaan abiotik dan biotik, sehingga menimbulkan kekhawatiran mengenai keamanan pangan dan kontaminasi silang (Liu et al., 2023).

Pada bakteri gram negatif, dinding selnya mengandung peptidoglikan dan juga lipopolisakarida, yang fungsinya melindungi sel. Bakteri ini sulit diberantas dengan obat antibiotik, yang sudah terserang umumnya tidak dapat disembuhkan. Bakteri yang resisten terhadap antibiotik dapat mentransfer gen resisten ke bakteri lain melalui air, udang, pakan, peralatan maupun aktivitas manusia (Saptiani et al., 2013). Selain itu pada penelitian Stalin & Srinivasan (2016) menjelaskan bahwa strain *Vibrio harveyi* di lingkungan budidaya udang di India menunjukkan resistensi antibiotik, sehingga menyoroti perlunya strategi biokontrol alternatif yang ditargetkan untuk meningkatkan budidaya udang untuk kebutuhan komersial.

Bakteri Gram-negatif *Vibrio harveyi* biasanya ditemukan di lingkungan laut dan dapat menyebabkan penyakit parah pada sistem budidaya laut dan air payau serta menimbulkan risiko kesehatan masyarakat. Kapasitas bakteri ini untuk membuat biofilm—sejenis mikroorganisme yang terdiri dari koloni bakteri yang terbungkus dalam matriks polisakarida ekstraseluler. Bakteri ini dilindungi oleh biofilm dari ancaman lingkungan seperti perubahan suhu, kekeringan, dan resistensi antibiotik. Menurut Ghazay & Mamdouh (2021), bahkan dengan adanya antibiotik, *Vibrio harveyi* dapat terus membentuk biofilm pada permukaan, menunjukkan resistensi terbesar pada pelat beton, plastik, dan baja. Hal ini dapat menyebabkan penyakit Vibriosis pada vertebrata dan invertebrata laut, yang dapat mengakibatkan kerugian besar bagi industri akuakultur di seluruh dunia. *Vibrio harveyi* dianggap berbahaya melalui pembuatan biofilm, motilitas berenang, dan sintesis beberapa produk

ekstraseluler, termasuk hemolisin, protease, lipase (fosfo), dan kitinase (Yang et al., 2014).

Banyak industri perairan telah dikembangkan untuk memproduksi dan mengeksport organisme laut, dan budidaya perairan merupakan segmen industri produksi pangan yang berkembang pesat. Berdasarkan data Organisasi Pangan dan Pertanian PBB, budidaya perairan merupakan salah satu sektor produksi pangan dengan tingkat pertumbuhan tercepat di dunia. Sejak tahun 1970, *output* industri ini telah tumbuh rata-rata tahunan sebesar 9,2% (Arunkumar et al., 2020).

Menurut Ramadhani et al (2019), setelah Tiongkok, India, dan Vietnam, Indonesia adalah produsen udang terbesar keempat di dunia, menyumbang sekitar 4,6% produksi udang global. Larva yang berkualitas harus diproduksi dalam jumlah yang cukup dan waktu yang tepat agar dapat menghasilkan udang vaname pasifik. Meskipun demikian, vibriosis, penyakit akibat bakteri yang disebabkan oleh *Vibrio harveyi*, terus menjadi kendala utama dalam produksi larva udang Vaname Pasifik di Indonesia. Sebuah penelitian sebelumnya Z. Huang et al (2016), menemukan bahwa selama fase postlarva (80%) dan juvenile (89,1-94,2%), bakteri *Vibrio* mendominasi sistem pencernaan udang Vaname Pasifik. Vibriosis memiliki tingkat kematian 100% dan dapat menyebabkan kerugian besar pada Udang Putih Pasifik.

Lactobacillus umumnya flora normal, berperan sebagai agen probiotik yang berfungsi menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan juga berfungsi untuk imunitas (kekebalan tubuh). *Lactobacillus* sebagai produk probiotik mempunyai keunggulan yang besar dibandingkan dengan bakteri asam laktat yang lain (Aini et al., 2021). Postbiotik adalah bahan metabolisme terlarut yang diproduksi oleh LAB; mereka sering disebut sebagai supernatan bebas sel, atau CFS. Senyawa ini dapat diproduksi oleh bakteri hidup atau dilepaskan selama pembelahan sel bakteri untuk mencegah dan mengendalikan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit dan perkembangan biofilm (Rouhi et al., 2024). *Cell-Free Supernatant* (CFS) yang mengandung mikroba spesifik atau senyawa antibakteri ekstraselulernya memiliki aktivitas antagonis, yang memberikan prospek menguntungkan untuk pengawetan makanan, suplemen pakan, dan perawatan hewan.

Selain aktivitas antimikroba, konsumsi bakteri asam laktat (BAL) memiliki banyak manfaat kesehatan, antara lain meningkatkan sistem kekebalan tubuh, mencegah infeksi usus, meningkatkan metabolisme laktosa, menurunkan kadar amonia dan kolesterol darah, serta toleransi yang kuat terhadap asam lambung dan empedu (Angmo et al., 2016). Klaim kesehatan *Lactobacillus plantarum* diizinkan untuk dikembangkan formulasi probiotik yang berbeda dan sifat antibakterinya menarik untuk keamanan pangan seperti dalam teknologi biopreservasi (Seddik et al., 2017).

Oleh karena itu keterkaitannya dengan makanan dan statusnya yang secara umum dianggap aman, penggunaan BAL atau metabolitnya sebagai obat alami telah mendapatkan perhatian besar dalam beberapa tahun terakhir (Arena et al., 2016). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk melihat potensi CFS *Lactobacillus plantarum* dalam menghambat pembentukan biofilm oleh bakteri *Vibrio harveyi* penyebab Vibriosis pada udang.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pembentukan biofilm oleh bakteri patogen *Vibrio harveyi* pada udang dan mengetahui potensi antibiofilm dari *cell-free supernatant Lactobacillus plantarum* terhadap *Vibrio harveyi* pada udang.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat sebagai sumber informasi ilmiah mengenai potensi antibiofilm *cell-free supernatant Lactobacillus plantarum* terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi* penyebab Vibriosis pada udang.

1.4 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari – April 2024 di Hasanuddin University Medical Research Center (HUMRC), Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, cawan petri, gelas beker, *microwave*, *magnetic stirrer*, inkubator, jarum ose, *Biological Safety Cabinet* (BSC), *microplate flat-bottom 96 wells*, *ELISA reader*, mikropipet, *microtube*, syringe filter 0,22 μm , sentrifus, spektrofotometer, erlenmeyer, tabung eppendorf, tabung reaksi, *hot plate*, timbangan analitik dan *vortex*. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* yang diperoleh dari stok kultur AGAVILab serta isolat bakteri *Vibrio harveyi* yang diperoleh dari stok kultur Balai Perikanan Budidaya Air Payau Takalar. Medium *Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar* (TCBSA) medium *DeMan Rogosa Sharpe Agar* (MRSA), medium *DeMan Rogosa Sharpe Broth* (MRSB), medium *Trypticase Soy Broth* (TSB), akuades, sukrosa, glukosa 1%, pewarna kristal violet 1%, asam asetat 30%, aluminium foil, kapas dan plastik *wrap*.

2.2 Tahapan Penelitian

Penelitian ini bersifat kualitatif dengan pendekatan deskriptif analitik. Menurut Sukardi (2009), metode deskriptif merupakan metode penelitian yang berusaha menggambarkan dan menginterpretasikan objek sesuai dengan apa adanya. Ratna (2012) menegaskan bahwa penelitian deskriptif analitik dilakukan dengan cara mendeskripsikan fakta-fakta yang kemudian disusul dengan analisis. Penelitian dilakukan dalam beberapa tahapan sebagai berikut.

2.2.1 Sterilisasi Alat

Proses sterilisasi alat dilakukan dengan membungkus alat dengan aluminium foil dan melakukan sterilisasi dalam autoklaf. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Sterilisasi ini bertujuan untuk menghancurkan semua bentuk kehidupan mikroba termasuk endospora yang dilakukan dengan proses kimia atau fisika.

2.2.2 Pembuatan Media

Media untuk peremajaan isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* menggunakan MRSA. Bakteri *Vibrio harveyi* diremajakan menggunakan media TCBS Agar. Ditimbang 6,82 gram bubuk MRSA dan dilarutkan ke dalam 100 mL akuades, dipanaskan pada *hot plate* hingga larut pada suhu 80 °C selama 30 menit. Ditimbang pula 8,8 gram bubuk TCBS Agar dan dilarutkan pada 100 mL akuades dengan cara yang sama.

Media pertumbuhan untuk pembuatan suspensi bakteri yang digunakan yaitu TSB. Ditimbang bubuk TSB sebanyak 3 gram dan dicampurkan dengan 100 mL akuades. Dipanaskan pada *hot plate* sampai mendidih selama 30 menit. Setelah semua media siap, selanjutnya dilakukan sterilisasi menggunakan

autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah steril, ditambahkan glukosa 1% sebanyak 0,5 gram ke dalam media TSB pada salah satu tabung erlenmeyer. Penambahan glukosa 1% untuk meningkatkan pembentukan biofilm bakteri.

Media untuk pembuatan *Cell-Free Supernatant* dari isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* menggunakan MRSB. Ditimbang 2,8 gram bubuk MRSB dan dilarutkan ke dalam 50 mL akuades, dipanaskan pada *hot plate* hingga larut pada suhu 80 °C selama 30 menit.

2.2.3 Peremajaan Isolat

Peremajaan isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* menggunakan media MRSA. Media MRSA yang telah steril dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 10 mL secara steril. Cawan petri ditutup dan media dibiarkan memadat. Selanjutnya, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan secara *zigzag* pada masing-masing media MRSA dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam.

Peremajaan isolat bakteri *Vibrio harveyi* menggunakan media TCBS Agar. Media TCBS Agar yang telah steril dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 10 mL secara steril. Cawan petri ditutup dan media dibiarkan memadat. Selanjutnya, isolat bakteri *Vibrio harveyi* diinokulasikan secara metode kuadran lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

2.2.4 Pembuatan *Cell-Free Supernatant* (CFS)

Pembuatan CFS dilakukan dengan mensuspensikan 5 ose inokulum bakteri *Lactobacillus plantarum* pada 45 mL media MRSB kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Suspensi selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 20°C. Setelah sentrifugasi, *supernatant* yang terbentuk disaring menggunakan *syringe filter* steril 0,22 µm.

Penentuan konsentrasi didasarkan pada hasil penelitian Lee et al (2021), berdasarkan penelitian tersebut, konsentrasi Hambat Minimum atau *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) yang diperoleh sebesar 12,5%. Maka variasi yang digunakan pada penelitian ini meliputi MIC-3xMIC sehingga didapatkan konsentrasi 12,5%, 25% dan 50%. Konsentrasi 12,5% dibuat dengan melarutkan 125 µL CFS yang terbentuk setelah sentrifugasi ke dalam media TSB hingga mencapai volume 1 mL. Konsentrasi 25% dibuat dengan 250 µL CFS ke dalam TSB hingga mencapai volume 1 mL. Konsentrasi 50% dibuat dengan melarutkan 500 µL CFS ke dalam media TSB hingga mencapai volume 1 mL. Semua suspensi kemudian dihomogenkan dengan vortex.

2.2.5 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan suspensi bakteri *Vibrio harveyi* menggunakan media TSB yang telah dicampur dengan glukosa 1%. Masing-masing satu ose biakan murni bakteri *Vibrio harveyi* dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi berisi 5 mL media TSB dengan penambahan glukosa secara steril kemudian dihomogenkan dengan vortex. Selanjutnya tabung ditutup lalu diinkubasi pada suhu ruang

selama 24 jam. Kepadatan bakteri *Vibrio harveyi* diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm hingga didapatkan OD 0,2.

2.2.6 Pembuatan Kelompok Kontrol

Kelompok kontrol terdiri dari kontrol negatif dan kontrol media. Kontrol negatif menggunakan suspensi bakteri *Vibrio harveyi*. Kontrol media dibuat dari campuran media TSB dan glukosa 1%.

2.2.7 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

Uji deteksi biofilm dilanjutkan dengan metode *Microtiter Plate Assay* (MtP) untuk mengetahui tingkatan pembentukan biofilm bakteri uji. Diinokulasikan 200 μ L suspensi bakteri *Vibrio harveyi* ke dalam sumur uji pada *microplate 96 well* steril. Kontrol negatif menggunakan 200 μ L campuran media TSB dan glukosa 1% dimasukkan ke dalam sumur kontrol negatif. Diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Isi *microplate* dibuang dan dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan pada suhu ruang selama 15 menit. Dilakukan pewarnaan biofilm dengan memasukkan 200 μ L kristal violet 1% ke dalam masing-masing sumuran dan dibiarkan selama 20 menit. Setelahnya, *microplate* dibilas kembali dengan akuades steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Ditambahkan 200 μ L asam asetat 30% ke dalam masing-masing sumuran dan didiamkan selama 15 menit. Uji dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Nilai OD kemudian diukur pada ELISA *reader* pada panjang gelombang 620 nm. Jika nilai OD bakteri uji lebih dari nilai OD kontrol negatif, maka bakteri tersebut positif membentuk biofilm. Perhitungan nilai *cut off* (ODcut) yaitu (Kirmusaoglu, 2019):

$$\text{ODcut} = \text{ODc} + (3 \times \text{SD ODc})$$

Keterangan: ODcut = *Optical Density cut-off*

ODc = *Optical Density control*

SD = Standar Deviasi

Interpretasi hasil sebagai berikut:

Tabel 2.1 Interpretasi nilai OD dan kekuatan pembentukan biofilm

Rata-rata Nilai OD	Kekuatan Produksi Biofilm
$\text{OD}_{\text{isolat}} \leq \text{ODcut}$	<i>Non biofilm production</i>
$\text{ODcut} < \text{OD}_{\text{isolat}} \leq 2x \text{ODcut}$	<i>Weak biofilm production</i>
$2x \text{ODcut} < \text{OD}_{\text{isolat}} \leq 4x \text{ODcut}$	<i>Moderate biofilm production</i>
$4x \text{ODcut} < \text{OD}_{\text{isolat}}$	<i>Strong biofilm production</i>

ODcut = *Optical Density cut-off value*,

OD_{isolat} = *Optical Density isolat*

Sumber: Kirmusaoglu, (2019)

2.2.8 Uji Aktivitas Biofilm

2.2.8.1 Uji Pencegahan Penempelan Biofilm (Kining dkk., 2016)

Uji pencegahan penempelan biofilm dilakukan dengan memasukkan 3 variasi presentasi 12,5%, 25%, dan 50% CFS *Lactobacillus plantarum* sebanyak 200 μ L ke dalam sumur uji. Kontrol media menggunakan 200 μ L campuran media TSB dan glukosa 1% dimasukkan ke dalam sumur kontrol media. *Microplate* kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Selanjutnya *microplate* dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali untuk mengeluarkan sisa sampel dan dikeringkan pada suhu ruang. Setelah kering, dimasukkan masing-masing 200 μ L suspensi bakteri *Vibrio harveyi* pada tiap sumur uji dan sumur kontrol negatif. Dimasukkan pula 200 μ L campuran media TSB dan glukosa 1% ke dalam sumur kontrol media. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 72 jam. Setelah inkubasi, *microplate* dibilas dengan akuades steril tiga kali untuk mengeluarkan sel planktonik lalu dikeringkan pada suhu ruang.

Dilakukan pewarnaan menggunakan kristal violet 1% sebanyak 200 μ L yang dimasukkan ke dalam *microplate* untuk mewarnai biofilm yang terbentuk lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. *Microplate* dibilas dengan akuades steril untuk melepaskan sel-sel yang tidak menempel pada *microplate* dan dibiarkan mengering pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 200 μ L asam asetat 30% dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. *Microplate* diamati menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 620 nm untuk mencari nilai OD (*Optical Density*). Perhitungan pencegahan penempelan biofilm menggunakan rumus berikut

$$\% \text{ Pencegahan penempelan biofilm} = \frac{\text{ODk} - \text{ODu}}{\text{ODk}} \times 100\%$$

Keterangan: ODkn = *Optical Density* kontrol negatif
ODuji = *Optical Density* uji

2.2.8.2 Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm

Uji penghambatan pembentukan biofilm dilakukan dengan memasukkan tiga variasi presentasi 12,5%, 25%, dan 50% CFS *Lactobacillus plantarum* sebanyak 100 μ L ke dalam sumur uji. Setelahnya ditambahkan masing-masing 100 μ L suspensi bakteri *Vibrio harveyi* ke dalam sumur uji. Kontrol media menggunakan 200 μ L campuran media TSB dan glukosa 1% dimasukkan ke dalam sumur kontrol media, sedangkan untuk kontrol negatif ditambahkan 200 μ L suspensi bakteri *Vibrio harveyi*. *Microplate* kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya *microplate* dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali untuk mengeluarkan sisa sampel dan dikeringkan pada suhu ruang.

Dilakukan pewarnaan menggunakan kristal violet 1% sebanyak 200 μ L yang dimasukkan ke dalam *microplate* untuk mewarnai biofilm yang terbentuk lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. *Microplate* dibilas dengan akuades steril untuk melepaskan sel-sel yang tidak menempel pada *microplate* dan

dibiarkan mengering pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 200 μ L asam asetat 30% dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. *Microplate* diamati menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 620 nm untuk mencari nilai OD (*Optical Density*). Perhitungan penghambatan pembentukan biofilm menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Penghambatan biofilm} = \frac{\text{ODk} - \text{ODu}}{\text{ODk}} \times 100\%$$

Keterangan: ODk = *Optical Density* kontrol negatif

ODu = *Optical Density* uji

2.2.8.3 Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm (Mohsenipour dkk., 2015)

Uji penghancuran/degradasi biofilm dilakukan dengan memasukkan 200 μ L suspensi bakteri *Vibrio harveyi* ke dalam sumur uji dan sumur kontrol negatif. Kontrol media menggunakan 200 μ L campuran media TSB dan glukosa 1% dimasukkan ke dalam sumur kontrol media. *Microplate* kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 72 jam. Selanjutnya *microplate* dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali untuk mengeluarkan sisa sampel dan dikeringkan pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 3 variasi presentasi 12,5%, 25%, dan 50% CFS *Lactobacillus plantarum* sebanyak 200 μ L ke dalam sumur uji dan 200 μ L campuran media TSB dan glukosa 1% pada kontrol media. *Microplate* ditutup dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Setelah diinkubasi, *microplate* dibilas menggunakan akuades steril tiga kali dan dikeringkan.

Dilakukan pewarnaan menggunakan kristal violet 1% sebanyak 200 μ L yang dimasukkan ke dalam *microplate* untuk mewarnai biofilm yang terbentuk lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. *Microplate* dibilas dengan akuades steril untuk melepaskan sel-sel yang tidak menempel pada *microplate* dan dibiarkan mengering pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 200 μ L asam asetat 30% dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. *Microplate* diamati menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 620 nm untuk mencari nilai OD (*Optical Density*). Perhitungan penghancuran biofilm menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Penghancuran biofilm} = \frac{\text{ODk} - \text{ODu}}{\text{ODk}} \times 100\%$$

Keterangan: ODk = *Optical Density* kontrol negatif

ODu = *Optical Density* uji

2.3 Analisis dan Interpretasi Data Penelitian

Data hasil penelitian yang telah diperoleh kemudian dianalisis lebih lanjut dan diinterpretasikan secara deskriptif, yang disajikan dalam bentuk tabel, grafik, narasi untuk mengungkap hubungan antar parameter dan faktor yang memengaruhinya.