

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki kekayaan sumber daya alam hayati yang sangat berlimpah. Salah satu kekayaan tersebut adalah sumber daya perikanan yang cukup besar, terutama dalam keanekaragaman jenis-jenis ikan. Saat ini pemerintah terus mengupayakan berbagai langkah untuk meningkatkan produktivitas bidang perikanan, baik perikanan air tawar, air payau, maupun air laut. Diyakini bahwa potensi budidaya perikanan yang dimiliki oleh Indonesia masih besar (Yuliana dan Zuriat, 2022)

Berdasarkan data statistika produksi usaha budidaya perikanan dari Kementerian Kelautan dan Perikanan Indonesia, total produksi budidaya perikanan di Indonesia pada tahun 2021 mencapai 14.648.309,71 ton, tahun 2022 mencapai 14.776.056,93 dan pada tahun 2023 naik hingga 16.967.518,25 ton. Peningkatan produksi budidaya perikanan menjadi sangat penting mengingat semakin luas dan intensifnya usaha budidaya ikan, yang juga berarti meningkatnya risiko timbulnya penyakit dan penurunan nafsu makan sehingga akan memperlambat laju pertumbuhan ikan serta hasil panen yang didapatkan tidak optimal (Azhar dan Wirasisya, 2019). Penyakit bakterial menjadi salah satu penyakit yang sering menimbulkan kerugian bagi pembudidaya ikan, karena dapat mengakibatkan kematian yang tinggi hingga menurunkan mutu daging ikan berupa borok atau lesi serta tampilan menjadi tidak menarik. Bahkan, sistem imunologi tubuh ikan dapat terganggu akibat infeksi serta perkembangan patogen dalam suatu lokasi budidaya (Umasugi *et al.*, 2018).

Usaha penanggulangan penyakit ikan, terutama penyakit bakterial, dapat dilakukan dengan menggunakan obat-obatan seperti antibiotik, atau dengan cara vaksinasi, serta dengan menerapkan manajemen budidaya yang baik. Namun, penggunaan antibiotik sebagai pengobatan untuk ikan yang sakit telah terbukti memiliki dampak negatif terhadap lingkungan dan kesehatan ikan itu sendiri. Penggunaan antibiotik dapat menyebabkan resistensi patogen terhadap antibiotik, akumulasi residu antibiotik pada produk perikanan, serta gangguan terhadap keseimbangan mikroba normal dalam usus ikan yang mengakibatkan terganggunya proses penyerapan nutrisi (Arwin *et al.*, 2016; Pandiyan *et al.*, 2013). Oleh karena itu, beberapa jenis antibiotik telah dilarang penggunaannya terutama sebagai imbuhan pakan yang tertuang dalam Pasal 16 Permentan No. 14 Tahun 2017 tentang Klasifikasi Obat Hewan.

Dalam rangka mencegah masuknya penyakit ke lingkungan budidaya, diperlukan pendekatan alternatif. Salah satu strategi yang sedang dieksplorasi adalah dengan penggunaan probiotik. Probiotik dapat membantu menjaga keseimbangan mikroba dan mengendalikan patogen dalam saluran pencernaan ikan melalui pakan serta meningkatkan kualitas lingkungan air untuk ikan. Strategi penggunaan probiotik ini diharapkan dapat menjadi solusi yang lebih aman dan berkelanjutan dalam menangani infeksi penyakit pada budidaya ikan (Pandiyan *et al.*, 2013). Adapun kelompok jenis bakteri yang sering digunakan sebagai probiotik yaitu jenis Bakteri Asam Laktat (BAL) yang merupakan mikroflora alami pada saluran pencernaan hewan. Secara fisiologis, bakteri ini diklasifikasikan sebagai bakteri gram positif dengan bentuk

coccus maupun *bacillus* yang tidak berspora (Rusli *et al.*, 2018; Mumtiah *et al.*, 2014).

Selain itu, terdapat inovasi bakteri yang dapat berpotensi menjadi probiotik pada ikan yaitu ODB (*Oil Degradation Bacteria*). Terdapat 9 kandidat bakteri ODB yang diberi kode ODB 1- ODB 9. Salah satu kode ODB yang dapat digunakan yaitu ODB 8. Penggunaan ODB 8 menjadi inovasi baru dalam pengembangan probiotik, yang dimana ODB 8 ini memiliki kemampuan untuk menurunkan nilai TPH (*Total Petroleum Hydrocarbons*) pada lingkungan perairan yang tercemar minyak dan lemak dengan tingkat laju pertumbuhan terbaik dalam mendegradasi minyak sekitar 83,06% dibandingkan kode ODB lainnya (Relatami *et al.*, 2023). Untuk dapat mengetahui kriteria dari bakteri tersebut diperlukan pengujian karakterisasi. Prinsip dari isolasi bakteri dilakukan dengan memisahkan atau memindahkan mikroba dari media atau dari lingkungan asalnya lalu menumbuhkannya di media buatan sehingga diperoleh biakan yang murni (Lusiastuti *et al.*, 2016; Andhini *et al.*, 2018; Puspitasari *et al.*, 2020).

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti kemudian melakukan eksplorasi pada salah satu isolat bakteri *Oil Degradation Bacteria* (ODB) yaitu ODB 8 yang ditemukan pada *oil catcher* untuk melihat potensinya sebagai kandidat bakteri probiotik, maka dari itu diperlukan pengamatan akan karakterisasi bakteri yang ada pada ODB 8 sebagai parameter layak atau tidaknya dijadikan kandidat bakteri probiotik pada ikan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan maka dapat diambil rumusan masalah yaitu bagaimana karakterisasi isolat bakteri *Oil Degradation Bacteria* (ODB) 8 sebagai kandidat probiotik pada ikan?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui kandidat probiotik pada ikan dari karakterisasi bakteri *Oil Degradation Bacteria* (ODB) 8.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dilakukannya penelitian ini adalah untuk menentukan kandidat probiotik bakteri dari *Oil Degradation Bacteria* (ODB) 8 berdasarkan karakteristiknya dengan pengujian pewarnaan gram, uji hemolisis, uji resistensi antibiotik, uji pH, uji salinitas, dan uji fermentasi karbohidrat.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat dimanfaatkan sebagai pengembangan produk probiotik yang dapat digunakan pada pembudidaya perikanan dan beberapa hewan serta sebagai referensi untuk penelitian selanjutnya.

1.5 Keaslian Penelitian

Keaslian penelitian ini dengan judul “Karakterisasi Isolat Bakteri *Oil Degradation Bacteria* (ODB) 8 Sebagai Kandidat Probiotik Pada Ikan” diyakinkan penulis tidak ada penelitian yang memiliki judul yang sama dengan penelitian penulis. Namun, penelitian yang berkaitan dengan penelitian ini telah dilakukan oleh Yosmaniar *et al.* (2017), dengan judul “Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Nitrifikasi Dan Denitrifikasi Sebagai Kandidat Probiotik”

1.6 Kajian Pustaka

1.6.1 *Oil Degradation Bacteri (ODB) 8*

Bakteri pendegradasi minyak atau *Oil Degradation Bacteria* (ODB) adalah mikroorganisme yang mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon dalam minyak bumi dengan memutuskan ikatan karbon dalam senyawa hidrokarbon yang seringkali bersifat berbahaya dan tidak ramah lingkungan. Bakteri tersebut menggunakan senyawa hidrokarbon sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhannya. Kemampuan bakteri ini dapat digunakan dalam proses bioremediasi untuk membersihkan lingkungan yang tercemar oleh minyak bumi seperti tumpahan minyak di perairan laut. Dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon, ODB menghasilkan enzim oksigenase agar dapat kontak langsung dengan substrat yang mengandung hidrokarbon dan memutus rantai hidrokarbon menjadi lebih pendek (Andhini *et al.*, 2018; Puspitasari *et al.*, 2020; Syafrizal *et al.*, 2020).

Oil Degradation Bacteria (ODB) 8 merupakan salah satu kode kandidat bakteri hasil inovasi riset dari PT DPPU (Depot Pengisian Pesawat Udara) Pertamina Makassar dengan memanfaatkan kandidat mikroorganisme yang dapat digunakan untuk bioremediasi yang diambil dari sampel *oil catcher* PT DPPU Pertamina Makassar.

1.6.2 Probiotik

Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang non patogenik yang memberikan efek baik dan menguntungkan bagi organisme inangnya jika dikonsumsi dalam jumlah tertentu (Rahmayanti *et al.*, 2020). Mekanisme kerja probiotik yaitu mampu bertahan hidup dalam saluran pencernaan, memberikan pertahanan untuk melawan bakteri patogen usus dengan menghasilkan suasana asam pada saluran pencernaan, memperbaiki efisiensi pakan serta memperbaiki kualitas lingkungan dengan melepas enzim-enzim yang membantu proses pencernaan makanan. Bakteri probiotik menghasilkan beberapa senyawa dari hasil metabolisme bakteri seperti asam laktat, hidrogen peroksida, bakteriosin yang bersifat sebagai antimikroba dan antibiotik mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen (Datta *et al.*, 2016). Bakteri probiotik yang terkandung dalam pakan dapat meningkatkan aktivitas bakteri dalam pencernaan ikan secara maksimal. Hal ini akan meningkatkan daya cerna ikan dalam menyerap sari-sari pakan dan meningkatkan kinerja pertumbuhan (Anshar *et al.*, 2023).

Penggunaan probiotik pada akuakultur lebih dikenal sebagai bakteri yang mampu memperbaiki kualitas air, mampu meningkatkan daya tahan tubuh ikan dan mampu meningkatkan pertumbuhan pada ikan (Suminto dan Chilmawati, 2015). Penggunaan bakteri probiotik merupakan salah satu solusi internal untuk meningkatkan pertumbuhan dan efisiensi pakan yang optimal, mengurangi biaya produksi sehingga dapat mengurangi beban lingkungan karena akumulasi limbah di media pemeliharaan. Selain itu, pemberian bakteri probiotik melalui pakan ikan dilakukan bertujuan agar dapat mendegradasi protein, lemak maupun karbohidrat dalam tubuh ikan. Selain itu, pemberian bakteri dalam pakan juga diharapkan dapat masuk dalam saluran pencernaan ikan sehingga dapat memperbaiki kemampuan ikan dalam mencerna pakan (Rahmawan *et al.*, 2014).

1.6.3 Syarat Bakteri Sebagai Kandidat Probiotik Pada Ikan

Berdasarkan data dari Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia No. 1 Tahun 2019 menyebutkan bahwa sediaan probiotik pada ikan harus dihasilkan dari mikroba non patogen yang secara alami ada dalam lingkungan di air dan dalam tubuh ikan yang bekerja dengan proses bioremediasi, biokontrol saluran cerna dan sebagai penyaing bakteri patogen antara lain bakteri *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus*, *Nitrosomonas*, dan *Nitrobacter*. Namun disebutkan juga bahwa probiotik pada ikan harus memenuhi beberapa ketentuan seperti:

- a. Dalam satu sediaan paling banyak mengandung 5 spesies mikroba dengan kepadatan masing-masing spesies paling sedikit 10^6 cfu/ml atau 10^6 cfu/g.
- b. Tidak mengandung pathogen.
- c. Tidak berasal dari negara atau negara transit yang terkena wabah penyakit ikan penting dan/atau penyakit ikan tertentu yang membahayakan untuk wabah penyakit ikan yang belum ada di wilayah Negara Kesatuan Republik Indonesia.

Syarat bakteri dapat menjadi kandidat probiotik terutamanya dengan nilai aktivitas proteolitik yang tinggi, tahan terhadap kondisi asam serta mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen tidak menghasilkan toksin, termasuk bakteri GRAS (*Generally Recognized As Safe*), tidak bersifat resisten terhadap antibiotik (Muliarto *et al.*, 2021; Chotiah dan Damayanti, 2018). Salah satu bakteri yang umum digunakan sebagai probiotik yaitu Bakteri Asam Laktat (BAL) yang merupakan suatu kelompok bakteri gram positif, tidak menghasilkan spora, berbentuk bulat atau batang, tahan terhadap pH rendah, mampu menghambat bakteri patogen serta tidak menghasilkan toksin (Rahmiati dan Simanjuntak, 2019).

Selain itu menurut Anggreni *et al.* (2015), bahwa persyaratan yang harus dimiliki oleh mikroba probiotik antara lain adalah 1) tidak bersifat patogen atau mengganggu inang; 2) tidak mengganggu keseimbangan ekosistem setempat; 3) mikroba tersebut hendaklah dapat dan mudah dipelihara dan diperbanyak; 4) dapat hidup dan bertahan serta berkembang biak di dalam usus ikan; 5) dapat dipelihara dalam media yang memungkinkan untuk diintroduksikan ke dalam usus ikan; dan 6) dapat hidup dan berkembang di dalam air wadah pemeliharaan ikan.

1.6.4 Bakteri Asam Laktat

Dalam perikanan, bakteri asam laktat lebih sering digunakan sebagai probiotik dalam pakan ikan. Bakteri asam laktat dapat digunakan sebagai probiotik pada pakan karena dimana bakteri asam laktat yang berada di dalam usus ikan mampu meningkatkan daya cerna dengan mengubah karbohidrat dengan serangkaian enzimatis menjadi asam laktat yang dapat menurunkan pH, sehingga merangsang produksi enzim endogenous untuk meningkatkan penyerapan nutrisi dan konsumsi pakan (Oktaviani *et al.*, 2021). Bakteri asam laktat adalah bakteri yang mampu memfermentasikan gula atau karbohidrat untuk memproduksi asam laktat dalam jumlah besar. Ciri-ciri bakteri asam laktat secara umum adalah selnya bereaksi positif terhadap pewarnaan Gram, bereaksi negatif terhadap katalase dan tidak membentuk spora. Dan fermentasi glukosa akan dihasilkan asam laktat. Tipe fermentasi bakteri asam laktat meliputi homofermentatif yaitu yang hasil fermentasinya hanya asam laktat dan heterofermentatif yang hasil fermentasinya di samping asam laktat ada asam organik lainnya seperti asetat, gas CO₂, dan etanol. Beberapa marga bakteri asam

laktat adalah *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, dan *Lactococcus* (Sari, 2019).

Bakteri asam laktat merupakan fastidious organism, tumbuh dengan baik pada medium kompleks. Asam laktat diproduksi sebagai metabolit primer, sehingga termasuk growth-associated product. Produksi BAL mempunyai hubungan linear dengan laju pertumbuhan. Hal ini menunjukkan bahwa untuk dapat dikatakan probiotik pertumbuhan bakteri asam laktat sangat dipengaruhi oleh komposisi pertumbuhan dan faktor lingkungan. Faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan produksi asam laktat adalah pH, suhu, dan garam empedu. Setiap spesies bahkan strain dapat memiliki pH terbaik yang berbeda untuk pertumbuhan dan produksi asam laktat (Okfrianti *et al.*, 2018).

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai dengan November 2024. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin dan juga di Politeknik Pertanian Negeri Pangkep.

2.2 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat deskriptif eksploratif yang dilakukan dengan cara mengambil sampel isolat murni ODB 8 yang akan dikarakterisasi.

2.3 Materi Penelitian

2.3.1 Alat

Alat penelitian yang digunakan adalah autoklaf, erlenmeyer, cawan petri, lampu bunsen, *hotplate*, gelas ukur, timbangan, sendok tanduk, kertas timbangan, pinset, mikroskop, inkubator, mikropipet, jarum ose, tabung reaksi, pH meter, *refractometer salinity*, kaca preparat, *cover glass*, pipet tetes

2.3.2 Bahan

Bahan penelitian yang digunakan adalah isolat bakteri ODB 8, alkohol, spiritus, safranin, iodine, kristal violet, plastik wrap, aluminium foil, *aquades*, disk antibiotik (*cefloxitin-μg*), media NA (*Nutrient Agar*), media *blood agar base*, media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), media TSA (*Tryptone Soya A.gar*), HCl, NaCl, kapas, darah domba, *microtube*, *vortex*, mikropipet tips.

2.4 Metode Penelitian

2.4.1 Pengambilan Sampel Isolat Bakteri ODB 8

Pengambilan isolat bakteri *Oil Degradation Bacteria* (ODB) 8 diperoleh dari riset penelitian terkait ODB yang sebelumnya telah dilakukan oleh Relatami *et al.*, (2023).

2.4.2 Pembuatan Media

2.4.2.1 Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Pembuatan media nutrient agar dilakukan dengan cara menimbang NA 2,8gr dan dilarutkan dalam 100ml *aquades*, kemudian panaskan di atas *hotplate* hingga homogen. Setelah itu, sterilkan pada autoklaf suhu 121°C selama 15 menit guna menghindari tumbuhnya mikroorganisme yang tidak diinginkan. Selanjutnya, setelah disterilisasi, media dapat dituangkan secara aseptik pada cawan petri steril untuk penggunaan (Juariah dan Sari, 2018).

2.4.2.2 Pembuatan Media *Blood Agar Base*

Pembuatan media *blood agar base* dilakukan dengan menimbang 4gr masukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 100ml *aquades*, kemudian panaskan di atas *hotplate* hingga larut sempurna. Kemudian sterilkan media dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah itu, media dituangkan secara aseptik pada cawan petri steril dan ditambahkan darah domba yang sudah didefibrinasi sebanyak 7ml lalu homogenkan (Krihariyani *et al.*, 2016).

2.4.2.3 Pembuatan Media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Pembuatan media TSIA dilakukan dengan menimbang 6,5gr dan dilarutkan dalam 100ml *aquades* kemudian dihomogenkan di atas *hotplate* hingga mendidih. Media kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Kemudian, sebanyak 5ml media dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dibiarkan pada posisi miring sampai media memadat (Ismail *et al.*, 2017).

2.4.2.4 Pembuatan Media TSA (*Tryptone Soya Agar*)

Pembuatan media TSA dilakukan dengan menimbang 4gr dan masukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian ditambahkan 100ml *aquades* ke dalam media dan dihomogenkan di atas *hotplate* hingga mendidih. Media disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Setelah itu, media dituangkan secara aseptik pada cawan petri dan biarkan hingga memadat (Anggraini *et al.*, 2016)

2.4.3 Isolasi Bakteri ODB 8

Uji Isolasi dilakukan dengan cara mengambil sampel bakteri ODB 8 dari media yang telah dimurnikan pada cawan petri, lalu dipindahkan atau diremajakan ke dalam media baru dengan metode *streak plate*. Dilakukan sterilisasi pada jarum ose dan cawan petri terlebih dahulu untuk menghindarkan kontaminasi. Media yang digunakan untuk meremajakan bakteri yaitu media *nutrient agar* (NA). Media NA termasuk ke dalam media universal yang sering digunakan untuk menumbuhkan dan mengembangbiakkan bakteri. Diambil sebanyak 1-2 ose pada media murni kemudian digoreskan pada permukaan media NA dengan metode kuadran dan selanjutnya diinkubasi secara terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam hingga terlihat koloni-koloni tunggal yang tumbuh (Pakaya *et al.*, 2022).



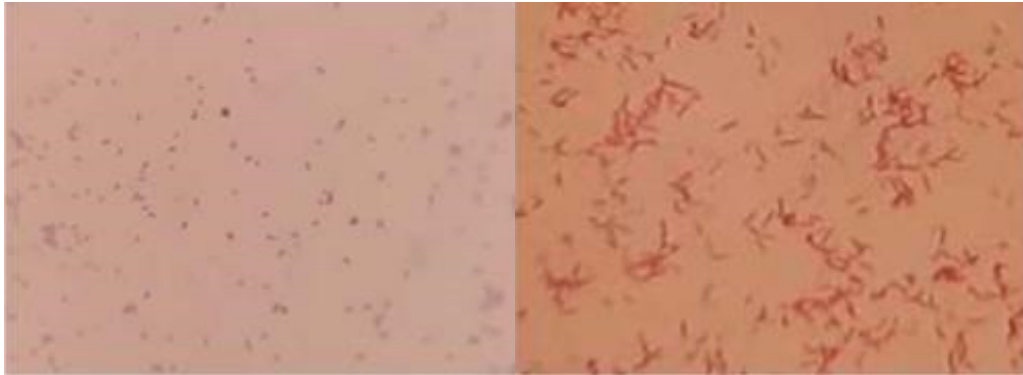
Gambar 1. Contoh hasil isolasi bakteri menggunakan metode *streak plate* di media NA (Pakaya *et al.*, 2022).

2.4.4 Uji Karakterisasi Isolat Bakteri ODB 8

2.4.4.1 Uji Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan gram dilakukan dengan menginokulasi 1-2 ose isolate pada permukaan kaca preparat dan dikeringkan dengan cara kering anginkan serta memanaskan bagian belakang kaca preparat tersebut dengan lampu bunsen. Selanjutnya ditetaskan kristal violet sebagai pewarna utama dan tunggu selama 1 menit, lalu cuci dengan air mengalir. Kemudian, preparat bilas dengan iodine biarkan

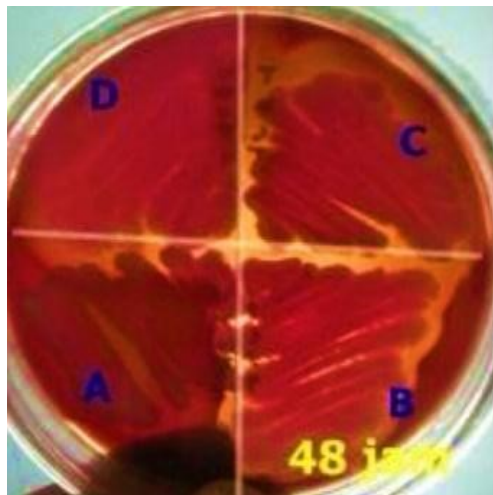
30 detik, lalu bilas dengan air mengalir. Alkohol 95% kemudian diteteskan pada preparat dan digoyang-goyangkan selama 15 detik, lalu bilas lagi dengan air mengalir, setelah itu preparat ditambah dengan safranin, dan didamkan selama 30 detik dan dibilas dengan air mengalir, dikeringanginkan dan siap di amati dibawa mikroskop. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui strain gram dari bakteri serta bentuk sel dari bakteri. Bakteri gram positif berwarna ungu atau violet sedangkan gram negatif berwarna merah jambu atau kemerah-merahan (Mustaqim *et al.*, 2014)



Gambar 2. Bakteri gram positif (kiri) dan bakteri gram negatif (kanan) (Rahmatullah *et al.*, 2021).

2.4.4.2 Uji Hemolisis

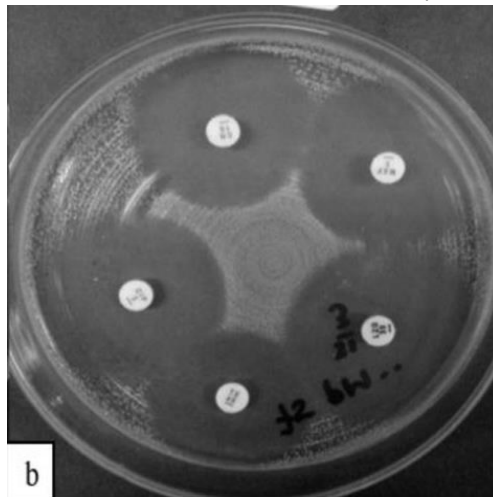
Uji hemolisis dilakukan dengan menginokulasikan 1-2 ose isolat pada permukaan media *blood agar*, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Interpretasi hasil dari uji hemolisis dibagi menjadi tiga sifat yaitu alfa hemolisis, beta hemolisis dan gamma hemolisis. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya seluruh zona bening/hambat di keliling koloni bakteri yang menunjukkan isolat bakteri berpotensi sebagai patogen dengan menghancurkan sel darah merah (Sodiq *et al.*, 2019).



Gambar 3. Contoh hasil uji hemolisis positif (B,C,D) pada media Blood Agar (Manalu, 2017).

2.4.4.3 Uji Resistensi Antibiotik

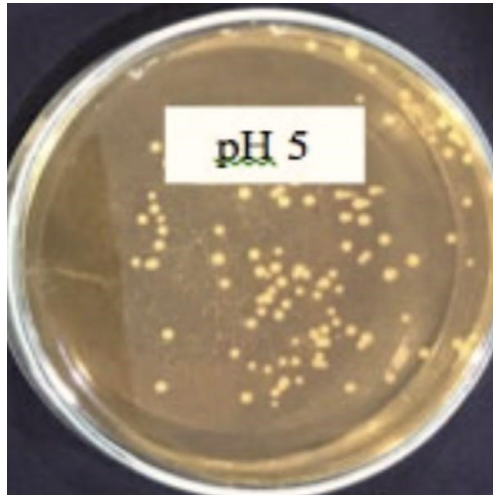
Uji resistensi antibiotik dapat dilakukan dengan metode *kirby-bauer*. Metode ini menggunakan kertas cakram (*paper disc*) dengan jenis antibiotik tertentu yang akan digunakan. Perbandingan kontrol negatif dapat menggunakan kertas cakram yang tidak mengandung antibiotik. Kertas cakram ditempatkan di atas media TSA yang sebelumnya diinokulasi secara merata dengan bakteri, kemudian diinkubasi selama 37°C selama 24 jam (Ramadhani *et al.*, 2024). Apabila terbentuk suatu zona bening di sekitar sumuran yang telah diberikan masing-masing konsentrasi antibiotik berarti pertumbuhan bakteri terhambat atau tidak kebal terhadap antibiotik tersebut (Ali *et al.*, 2018) Selain itu, resistensi antibiotik juga dapat diukur berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran antibiotik. Semakin besar zona hambat yang terbentuk maka resistensi bakteri tersebut semakin kecil (Mardiah, 2017).



Gambar 4. Contoh hasil uji resistensi antibiotik dengan melihat zona hambatan yang terbentuk (Purnamasari *et al.*, 2023).

2.4.4.4 Uji pH

Uji pH dilakukan untuk mengetahui kemampuan pertumbuhan bakteri pada pH yang berbeda. Pengujian pH pada isolat dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri pada masing-masing media TSA. Pengaturan pH dilakukan dengan menggunakan *aquades* yang ditambahkan dengan HCl untuk menurunkan pH agar sesuai dengan pH yang dibutuhkan yaitu pH 2,5,7 yang diukur menggunakan pH meter. Selanjutnya, *aquades* dengan pH yang sudah diatur dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi media TSA dan dihomogenkan. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri pada masing-masing media (Sinubu *et al.*, 2022)



Gambar 5. Uji pH (Suryani et al., 2023)

2.4.4.5 Uji Salinitas

Uji salinitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan pertumbuhan bakteri dalam menoleransi kadar garam. Isolat bakteri ditumbuhkan pada media TSA yang mengandung beberapa tingkat konsentrasi NaCl. Pengaturan konsentrasi salinitas dilakukan dengan menggunakan *aquades* yang ditambahkan dengan NaCl untuk meningkatkan agar sesuai dengan salinitas yang dibutuhkan yaitu salinitas 5 ppt (*part per thousand*), 15 ppt, dan 30 ppt yang diukur menggunakan *refractometer*. Selanjutnya *aquades* dengan salinitas yang sudah diatur dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi media TSA dan homogenkan. Respon pertumbuhan koloni bakteri terhadap salinitas diamati selama 48 jam dengan diinkubasi pada suhu 37°C. Hasil yang diamati berupa ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada konsentrasi salinitas yang berbeda-beda (Arisandi *et al.*, 2017). Bakteri yang dianggap tumbuh sedikit apabila mencari <30% koloni bakteri menutupi media. Pertumbuhan bakteri dianggap baik jika >30% koloni bakteri menutupi media (Sumardi *et al*, 2021)



Gambar 6. Uji Salinitas (Arisandi *et al.*, 2017)

2.4.4.6 Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri yang dapat memfermentasikan karbohidrat. Pengujian ini menggunakan media TSIA dimana media TSIA ini terdapat laktosa, sukrosa dan glukosa (Pelt *et al.*, 2016). Setelah media memadat pada tabung reaksi, secara aseptik isolat bakteri diinokulasikan dengan jarum ose dengan cara ditusuk pada bagian tengah sampai kedalaman $\frac{3}{4}$ bagian dari permukaan media dan kemudian digores pada bagian miring dari media. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna pada media, saat perubahan asam terlihat sebagai perubahan warna substrat karbohidrat dari warna merah menjadi warna kuning dan juga adanya zona hitam mendandakan pembentukan gas H_2S (Kosasi *et al.*, 2019)

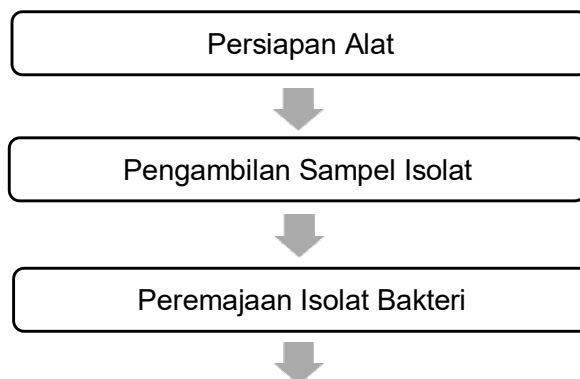


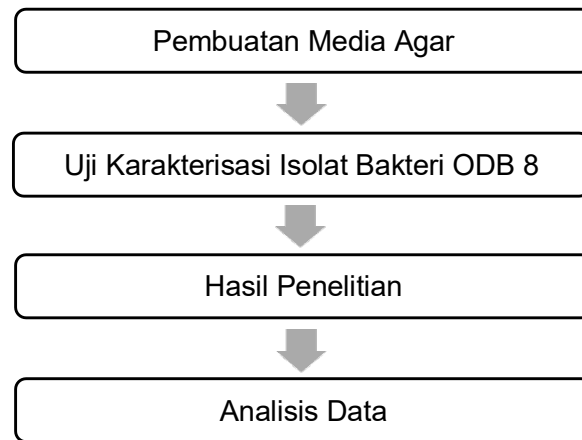
Gambar 7. Uji Fermentasi Karbohidrat (Pelt *et al.*, 2016)

2.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari isolasi dan karakterisasi melalui uji pewarnaan gram, uji hemolisis, resistensi antibiotik, pH, salinitas, dan fermentasi karbohidrat terhadap isolat bakteri ODB 8 sebagai kandidat probiotik pada ikan dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk tabel.

2.6 Alur Penelitian





Gambar 8. Alur Penelitian