

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan usaha budidaya perikanan mengalami peningkatan dari tahun ketahun. Hal ini dikarenakan semakin bertambahnya kesadaran masyarakat untuk mengkonsumsi ikan. Dalam budidaya ikan, masalah utama yang dihadapi dalam proses budidaya adalah serangan penyakit. Kematian ikan dan kegagalan panen akan dialami jika serangan penyakit tidak ditanggulangi secara dini. Untuk menghindari keadaan ini, perlu dilakukan upaya pencegahan dan penanggulangan penyakit secara tepat (Utomo *et al.*, 2022). Pada umumnya, kendala yang dihadapi oleh petani pembudidaya ikan yaitu ikan yang dibudidayakan mudah terserang penyakit dan nafsu makan yang rendah sehingga menyebabkan pertumbuhan ikan lambat serta hasil yang panen yang didapatkan tidak optimal (Rahmayanti *et al.*, 2020).

Upaya untuk mencegah ikan agar tidak terserang penyakit adalah dengan meningkatkan daya tahan tubuh ikan atau dengan mengontrol lingkungan budidaya. Kontrol lingkungan budidaya dapat dilakukan dengan cara mengontrol kualitas air. Kualitas air adalah salah satu faktor penting dalam budidaya, karena bukan hanya untuk tempat hidup ikan saja akan tetapi juga untuk semua kehidupan yang ada di dalam perairan tersebut. Salah satu penyebab turunnya kualitas air adalah pencemaran lingkungan (Khotimah *et al.*, 2016).

Pencemaran lingkungan paling banyak terjadi di daerah perairan yang disebabkan oleh senyawa hidrokarbon yang mengakibatkan merosotnya kualitas air, rusaknya rantai makanan, dan terputusnya siklus biologi dari biota laut. Hidrokarbon mengandung unsur carbon dan hidrogen yang berstruktur alifatik, alisiklik, aromatik, dan bersifat non polar. Sumber hidrokarbon dapat berasal dari tumpahan minyak kapal tanker yang melintasi perairan, akumulasi limbah rumah sakit dan industri kimia, serta eksplorasi minyak bumi yang menyebabkan senyawa tersebut tersuspensi pada kolom air (Umar, 2015).

Berbagai kegiatan eksplorasi, eksploitasi, transportasi melalui media laut, sering menghasilkan kejadian kebocoran tumpahan minyak ke lingkungan. Tumpahan minyak di laut telah berdampak terhadap pencemaran multidimensi bagi makhluk hayati laut itu sendiri, usaha perikanan, usaha pariwisata, sampai kepada tingkat kerusakan laut. Kecelakaan tanker pengangkut minyak, tumpahan minyak mentah dari kegiatan eksplorasi minyak bumi sering terjadi di perairan Indonesia, yang memerlukan perhatian dan tindakan bioremediasi yang lebih optimum dengan memanfaatkan teknologi biostimulasi dan bioaugmentasi salah satunya pembuatan probiotik (Riffiani, 2010).

Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang sangat bermanfaat bagi mahluk hidup, mikroorganisme yang terkandung dalam probiotik mampu membantu proses pencernaan makanan pada ikan sehingga pakan akan dicerna dan diserap dengan baik dan juga mampu meningkatkan kekebalan tubuh ikan dari serangan penyakit (Narayana & Hasniar, 2019). Maka dari itu perkembangan usaha budidaya akhir-akhir ini telah mengembangkan penggunaan probiotik sebagai solusi untuk meninggalkan penggunaan bahan-bahan kimia dan antibiotik. Karena penggunaan probiotik dalam bidang budidaya

dapat menjaga keseimbangan mikroba dan mengendalikan patogen dalam saluran pencernaan (Umasugi *et al.*, 2018).

Penggunaan probiotik telah lama dilakukan dan dirasakan manfaatnya oleh para petani ikan dalam pemanfaatan pakan yang efisien. Probiotik mampu berperan sebagai imunostimulan, meningkatkan rasio konversi pakan, mempunyai daya hambat pertumbuhan bakteri patogen, menghasilkan antibiotik, serta peningkatan kualitas air. Selain itu dari beberapa penelitian yang dilakukan, probiotik digunakan untuk peningkatan produksi akuakultur, meningkatkan resistensi terhadap penyakit dan membantu dalam peningkatan pertumbuhan. Salah satu mikroorganisme yang dapat dimanfaatkan dalam pembuatan probiotik yaitu bakteri pendegradasi minyak (Khotimah *et al.*, 2016).

Salah satu kelompok bakteri yang dapat dimanfaatkan sebagai probiotik dimana mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon dengan memanfaatkan senyawa tersebut sebagai sumber karbon dan energi yang diperlukan bagi pertumbuhannya yaitu Bakteri Degradasi Minyak atau *Oil degradation bacteria* (ODB). Berdasarkan riset yang dilakukan oleh Arizal *et al.* (2023), didapatkan 9 jenis ODB, salah satunya yaitu diberi nama ODB 1. ODB 1 yang diimplementasikan sebagai *oil catcher* memiliki kemampuan dalam mendegradasi minyak dengan laju degradasi sebesar 83,08% selama 7 hari. Limbah minyak yang mencemari lautan dapat menurunkan kualitas air serta dapat menimbulkan kematian pada organisme laut, sehingga pengendalian pencemaran dengan mikroba berupa bakteri pendegradasi minyak dapat menjadi solusi ramah lingkungan dimasa mendatang dan mampu bersaing serta berkonsorsia dengan mikroorganisme lainnya (Hasyimuddin *et al.*, 2016).

Maka dari itu penelitian ini bertujuan untuk melakukan eksplorasi dan mengkaji lebih lanjut bakteri *oil degradation bacteria* (ODB) 1 sebagai salah satu cara untuk mengenalkan potensi sebagai bakteri probiotik, maka dari itu diperlukan pengamatan akan karakterisasi spesies bakteri yang ada pada ODB 1 sebagai parameter layak atau tidaknya dijadikan kandidat bakteri probiotik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka diperoleh rumusan masalah yaitu bagaimana karakterisasi isolat bakteri *oil degradation bacteria* (ODB) 1 sebagai kandidat probiotik pada ikan ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian dengan judul karakterisasi isolat bakteri *oil degradation bacteria* (ODB) 1 sebagai kandidat probiotik pada ikan dapat dijadikan sumber wawasan pengetahuan dalam pemanfaatan probiotik sebagai suplemen kesehatan bagi ikan dan dapat menjadi acuan penelitian berkelanjutan terkait perkembangan isolat bakteri *oil degradation* sebagai kandidat yang berpotensi sebagai probiotik.

1.3.2 Tujuan Khusus

Untuk menentukan kandidat probiotik bakteri dari *oil degradation bacteria* (ODB) 1 berdasarkan karakteristiknya dengan metode isolasi bakteri ODB 1, pewarnaan gram,

uji hemolisis, uji resistensi antibiotik, uji pH, uji salinitas, dan uji fermentasi karbohidrat.

1.4 Keaslian Penelitian

Publikasi penelitian mengenai Karakterisasi Isolat Bakteri *Oil Degradation Bacteria* (ODB) 1 Sebagai Kandidat Probiotik Pada Ikan belum pernah dilakukan. Namun, terdapat penelitian sejenis yang pernah dilakukan antara lain :

1. Karina, R. P. (2018). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Asal Kolon Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*) Sebagai Kandidat Probiotik. *Malang: Universitas Brawijaya*.
2. Yosmaniar, Y., Novita, H., & Setiadi, E. (2018). Isolasi dan karakterisasi bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi sebagai kandidat probiotik. *Jurnal Riset Akuakultur*, 12(4), 369-378.

1.5 Kajian Pustaka

1.5.1 *Oil Degredation Bacteria*

Oil Degradation Bacteria merupakan mikroorganisme yang mampu mendegradasi minyak bumi dan hidrokarbon. Mereka memiliki kemampuan untuk memecah senyawa organik kompleks dalam minyak menjadi senyawa yang lebih sederhana melalui produksi enzim terutama oksigenase (Puspitasari *et al.*, 2020). 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 (Syafrizal *et al.*, 2020).

Beberapa jenis bakteri yang merupakan pendegradasi hidrokarbon yang efektif di lingkungan alami telah diisolasi antara lain *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas sp.*, *Alcaligenes paradoxus*, *Bacillus licheniformis*, *Flavobacterium lutescens*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Vibrio parahaemolyticus* (Andreas, 2019).

Bakteri pendegradasi minyak mengolah senyawa hidrokarbon melalui serangkaian mekanisme biokimia. Mereka mampu memecah senyawa hidrokarbon yang terdapat dalam minyak bumi menjadi senyawa yang lebih sederhana melalui proses oksidasi. Bakteri ini menggunakan senyawa hidrokarbon sebagai sumber karbon dan energi untuk aktivitas metabolisme mereka. Proses ini menyebabkan penurunan konsentrasi senyawa hidrokarbon yang berbahaya dan mengubahnya menjadi struktur yang ramah lingkungan. Bakteri pendegradasi minyak efisien dalam memanfaatkan karbon dari minyak bumi sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan aktivitas metabolisme (Sopiah *et al.*, 2011).

1.5.2 Karakteristik Probiotik

Probiotik merupakan makanan tambahan berupa sel-sel mikroba hidup, yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi hewan inang yang mengkonsumsinya melalui penyeimbangan flora mikroba intestinalnya. Probiotik sebagai penambah mikroba hidup yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi komunitas mikroba lingkungan hidupnya. Probiotik merupakan segala bentuk preparasi sel mikroba atau komponen sel mikroba

yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi kesehatan dan kehidupan inang (Supriatna *et al.*, 2016).

Berdasarkan data dari Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia No. 1 Tahun 2019 menyebutkan bahwa sediaan probiotik pada ikan harus dihasilkan dari mikroba nonpatogenik 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* (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2019).

Menurut Supriatna *et al.* (2016), pada saat memilih mikroorganisme yang akan dijadikan probiotik, persyaratan yang harus dimiliki oleh mikroba probiotik antara lain adalah ; 1) tidak bersifat patogen atau mengganggu inang, tidak bersifat patogen bagi konsumen (manusia dan hewan lainnya), 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 diintroduksi ke dalam usus ikan, dan 6) dapat hidup dan berkembang di dalam air wadah pemeliharaan ikan.

1.5.3 Bakteri Pendegrasi Minyak (ODB) Sebagai Kandidat Probiotik

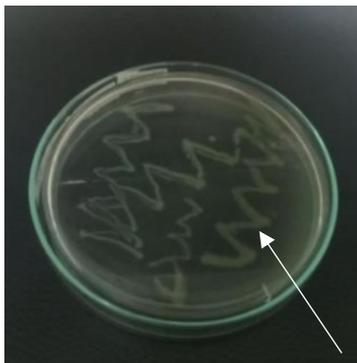
Berdasarkan hasil penelitian yang ditemukan, bakteri ODB (*Oil Degradation Bacteria*) merupakan bakteri yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi minyak bumi dan hidrokarbon. Sebagai probiotik, bakteri ODB diyakini memiliki potensi untuk menghasilkan senyawa antimikroba, mengkolonisasi saluran pencernaan untuk sementara, dan memproduksi asam-asam organik secara efisien (Fitria *et al.*, 2018).

Bakteri ODB dapat memanfaatkan hidrokarbon dari minyak bumi baik secara utuh maupun sebagian untuk proses metabolismenya. Pemanfaatan bakteri hidrokarbonoklastik yang diisolasi langsung dari habitatnya sebagai agen pendegradasi hidrokarbon dapat mempersingkat waktu bioremediasi. Pada lingkungan tidak tercemar minyak kemungkinan keberadaan mikroorganisme pendegradasi hidrokarbon kurang dari 0.1 % dan pada lingkungan tercemar minyak 100% mikroorganisme berpotensi mendegradasi hidrokarbon (Fitria *et al.*, 2018).

1.5.4 Isolasi Bakteri

Berdasarkan Isolasi bakteri merupakan proses pengambilan bakteri dari medium atau lingkungan asalnya, dan menumbuhkan pada medium buatan sehingga diperoleh biakkan atau kultur murni hasil isolasi tersebut. Populasi bakteri dapat diisolasi menjadi biakkan atau kultur murni, terdiri dari satu jenis bakteri yang dapat dipelajari morfologi, sifat, dan kemampuan biokimianya. Media pertumbuhan bakteri sangat beragam, mulai dari media selektif, media pengkaya, media differential dan lain sebagainya. Masing-masing media mempunyai fungsi berbeda dan digunakan tergantung tujuan. Dalam mempelajari sifat pertumbuhan dari masing-masing jenis mikroorganisme, maka mikroorganisme tersebut harus dipisahkan satu dengan yang lainnya, sehingga didapatkan kultur murni yang disebut isolat. Kultur murni merupakan suatu biakan yang terdiri dari sel-sel yang berasal dari satu spesies atau satu galur mikroorganisme. Kultur murni diperoleh dengan cara isolasi menggunakan metode tuang ataupun gores. Supaya

hasil biakan baik, maka kultur harus dilakukan secara aseptik, berapa jenis bakterinya, dan isolasi jenis-jenis bakteri tertentu (Sabbathini *et al.*, 2017).



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

Salah satu teknik isolasi bakteri yang umum digunakan yaitu teknik penanaman dengan goresan (*streak*). Isolasi bakteri dengan cara penggoresan bertujuan membuat garis sebanyak mungkin pada permukaan medium pembiakan, dengan jarum ose yang terlepas pada garis-garis tersebut semakin lama semakin sedikit, sehingga pada garis terakhir koloni yang terbentuk akan terpisah agak jauh. Cara penggoresan dilakukan dengan menuangkan terlebih dahulu medium agar pada cawan petri steril. Jarum ose yang digunakan dipanaskan dahulu hingga memijar, setelah itu disentuhkan pada koloni bakteri yang akan diisolasi, kemudian digoreskan pada medium yang tersedia. Menginkubasi selama 2x24 jam pada suhu ruang, lalu melakukan pengamatan (Pakaya *et al.*, 2022).

1.5.5 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) diklasifikasikan dalam filum Firmicutes, kelas Bacillus, dan ordo Lactobacillales. Bakteri ini termasuk Gram-positif, non-endospora, dengan morfologi berbentuk batang atau bulat (kokus), bersifat katalase negatif dan oksidase negatif dan kebanyakan dari mereka adalah non-motil. Pertumbuhan optimum bakteri asam laktat umumnya pada pH 5,5-5,8, dan memiliki kebutuhan nutrisi yang kompleks. Mereka dibagi menjadi homofermentatif dan heterofermentatif. Homofermentatif menghasilkan asam laktat dari gula, sedangkan heterofermentatif menghasilkan asam laktat, asam asetat atau alkohol, dan karbon dioksida. Sifat yang menguntungkan dari bakteri asam laktat adalah mereka menghasilkan substansi penghambat pertumbuhan seperti bakteriosin, hidrogen peroksida, diasil, dan lain-lain; mencegah proliferasi patogen dan bakteri pembusuk di makanan (Agustina *et al.*, 2023).

Menurut Agustina (2023), diketahui bahwa beberapa strain bakteri asam laktat (BAL) dapat melindungi ikan dari patogen usus dengan beberapa mekanisme diantaranya produksi zat penghambat, seperti asam organik, hidrogen peroksida, bakteriosin, dan karbon peroksida. Mekanisme aksi lainnya ditunjukkan oleh bakteri asam laktat melalui pemanfaatan nutrisi yang lebih baik, sifat antibakteri, serta peningkatan respons imun pada ikan dalam menghadapi infeksi patogen. Di antara kelompok bakteri asam laktat, bakteri yang paling efektif menunjukkan peran positif

tersebut yaitu *Lactococcus lactis*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus plantarum*, dan *Leuconostoc mesenteroides*. Di antara kelompok probiotik yang ada, kelompok *Lactobacilli* dianggap sebagai salah satu pengganti antibiotik yang paling efektif.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober hingga November 2024. Pengambilan isolat bakteri *Oil Degradation* Bacteria (ODB) 1 dari penelitian Relatami *et al* 2023. Kemudian, pengujian sampel isolat dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin dan 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 1 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, , pH meter, *refractometer salinity* dan tabung reaksi.

2.3.2 Bahan

Bahan penelitian yang digunakan adalah isolat bakteri ODB 1, alkohol, spiritus, plastik wrap, aluminium foil, *aquades*, media *Nutrient Agar* (NA), *blood agar*, darah domba, disk antibiotik (*cefloxitin*), media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), media TSA (*Tryptone Soya Agar*), HCl, NaCl, kapas, *microtube*, *vortex*, dan mikropipet tips.

2.4 Metode Penelitian

2.4.1 Pengambilan Sampel Isolat Bakteri ODB 1

Pengambilan sampel isolat bakteri melalui PT DPPU Pertamina Makassar yang telah diisolasi melalui *oil catcher* dan menjadi isolat murni dengan pemberian kode ODB 1.

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 hingga media memadat.

2.4.2.2 Pembuatan Media *Blood Agar Base*

Pembuatan media blood agar base dilakukan dengan menimbang 4 gr masukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 100 ml *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 dan dibiarkan hingga media memadat

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.

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.

2.4.3 Isolasi Bakteri ODB 1

Uji Isolasi dilakukan dengan cara mengambil sampel bakteri ODB 1 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 menghindari kontaminasi. Media yang digunakan untuk meremajakan bakteri yaitu media 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

2.4.4 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan untuk melihat bentuk-bentuk sel bakteri dan untuk mengetahui golongan bakteri termasuk gram positif atau gram negatif. Uji pewarnaan gram dilakukan dengan metode standar, kaca preparat yang akan digunakan dibersihkan dengan alkohol lalu dipanaskan di dekat nyala api. Isolat bakteri kemudian ditetaskan pada kaca preparat menggunakan mikropipet, kemudian dipanaskan di dekat api hingga isolat kering. Isolat bakteri ditetesi dengan kristal violet yang berfungsi untuk pewarnaan agar memberi warna pada mikroorganisme. Kemudian didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan lugol, didiamkan selama 2 menit dan selanjutnya dicuci dengan *aquades*. Hasil pewarnaan lugol ditetesi dengan etanol lalu dicuci dengan *aquades*. Hasil pewarnaan dengan etanol ditetesi dengan safranin yang berfungsi untuk mewarnai inti sel menjadi merah, didiamkan selama 1 menit kemudian dicuci kembali dengan *aquades* dan dilakukan pengamatan dibawah mikroskop.

2.4.5 Uji Karakterisasi Isolat Bakteri ODB 1

2.4.5.1 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 alpha 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

2.4.5.2 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. 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. 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

2.4.5.3 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.

2.4.5.4 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. Bakteri yang dianggap tumbuh sedikit apabila mencari <30% koloni bakteri menutupi media. Pertumbuhan bakteri dianggap baik jika >30% koloni bakteri menutupi media.

2.4.5.5 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. 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 pembentukan gas terjadi di dasar media yang ditandai dengan adanya ruang kosong di dasar media.

2.5 Analisis data

Data yang diperoleh dari isolasi dan karakterisasi melalui uji hemolisis, resistensi antibiotik, pH, salinitas, dan fermentasi karbohidrat terhadap isolat bakteri ODB 1 sebagai kandidat probiotik pada ikan dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk tabel.

2.6 Alur Penelitian

