

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Indonesia menjadi negara kepulauan terbesar dengan luas wilayah laut sebesar 5,8 juta km<sup>2</sup> yang kaya akan sumber daya alam yang dapat dimanfaatkan. Salah satu kekayaan alamnya adalah Indonesia memiliki sumber daya perikanan yang sangat melimpah, baik dalam jumlah maupun keragaman spesiesnya. Potensi perikanan tangkap di Indonesia mencapai 12 juta ton dan telah dieksploitasi sekitar 7.8 juta ton. Produksi budidaya perikanan di Indonesia juga mengalami peningkatan signifikan dari tahun ke tahun, seperti pada tahun 2010 yang mencapai 1,98 juta ton dan meningkat menjadi 49% pada tahun 2014 (3,9 juta ton) (Agung, 2023; Prayitno *et al.*, 2017; FAO, 2016).

Peningkatan produksi budidaya perikanan menjadi sangat penting mengingat semakin luas dan intensifnya usaha budidaya perikanan, yang juga berarti meningkatnya risiko serangan penyakit. Pada tahun 1980an terjadi kematian masal pada ikan akibat penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen yang sering menginfeksi organisme budidaya. Hingga saat ini penyakit bakteri masih menjadi hambatan utama bagi pembudidaya perikanan, karena dapat menyebabkan penurunan pertumbuhan ikan sehingga periode pemeliharaan juga lebih lama dan bahkan dapat menyebabkan kematian pada ikan sehingga mengakibatkan menurunnya tingkat produksi yang membuat pembudidaya perikanan mengalami kerugian ekonomis. Umumnya, permasalahan penyakit infeksi bakteri pada ikan diatasi menggunakan pemberian obat-obatan kimia dan antibiotik (Azhar & Wirasisya, 2019; Prayitno *et al.*, 2017; Pandiyan *et al.*, 2013).

Penggunaan antibiotik sebagai pengobatan untuk ikan yang sakit ternyata memberikan dampak negatif terhadap lingkungan dan ikan itu sendiri. Upaya ini menimbulkan permasalahan baru berupa resistensi patogen terhadap antibiotik, terakumulasinya residu antibiotik pada produk perikanan serta dapat mengganggu keseimbangan mikroba normal dalam usus yang mengakibatkan terganggunya proses penyerapan nutrisi. Oleh sebab itu, penggunaan antibiotik telah dilarang oleh Permentan No. 14 Tahun 2017 tentang klasifikasi obat hewan yang tertuang pada pasal 16 dan 17 melarang penggunaan antibiotik sebagai imbuhan pakan dan menjelaskan pencampuran obat hewan untuk terapi sesuai dengan petunjuk dan dibawah pengawasan karena dapat menimbulkan masalah kesehatan. Sehingga diperlukan alternatif lain untuk mencegah penyakit tersebut masuk ke lingkungan budidaya, salah satunya dengan penerapan probiotik (Gustiana *et al.*, 2015 dan Pandiyan *et al.*, 2013).

Probiotik merupakan mikroba yang menguntungkan bagi kesehatan ikan melalui peningkatan nilai nutrisi pakan dan meningkatkan daya tahan tubuh ikan terhadap penyakit serta meningkatkan kualitas lingkungan air. Probiotik juga mampu

berperan sebagai imunostimulan serta mempunyai daya hambat pertumbuhan bakteri patogen. Berdasarkan data dari Peraturan menteri KKP No. 1 Tahun 2019 tentang klasifikasi obat ikan pada pasal 4 dan 5 probiotik termasuk dalam golongan jenis sediaan obat ikan yang dihasilkan dari mikroba nonpatogenik yang secara alami ada dalam lingkungan air dan dalam tubuh ikan yang bekerja dengan proses bioremediasi, biokontrol saluran cerna dan sebagai penyaing bakteri patogen. Kelompok bakteri yang tergolong probiotik adalah kelompok bakteri asam laktat (BAL) yang merupakan mikroflora alami pada saluran pencernaan hewan. Secara fisiologis bakteri ini di klasifikasikan sebagai bakteri gram positif dengan bentuk coccus yang tidak berspora, tahan terhadap pH rendah. Selain itu, terdapat bakteri yang diharapkan memiliki potensi menjadi probiotik pada ikan yaitu *oil degradation bacteria* (ODB) (Azhar & Wirasisya, 2019; Rusli *et al.*, 2018; Mumtiah *et al.*, 2014)

*Oil Degradation Bacteria* (ODB) merupakan jenis bakteri yang memiliki potensi dalam mendegradasi minyak dengan cara memutuskan ikatan karbon yang terdapat dalam senyawa hidrokarbon yang seringkali bersifat berbahaya menjadi struktur lain yang ramah lingkungan. ODB ini timbul secara alamiah pada lingkungan yang telah lama tercemar seperti di perairan serta pada kolam pengolahan limbah. Berdasarkan riset yang dilakukan dari Relatami *et al.* (2023), ditemukan jenis bakteri pendegradasi minyak yang diberi nama ODB 3. ODB 3 dapat digunakan dalam proses bioremediasi untuk membersihkan lingkungan yang tercemar oleh minyak bumi seperti, tumpahan minyak di perairan laut. ODB 3 memiliki kemampuan menurunkan nilai TPH (*Total Petroleum Hydrocarbons*) berupa minyak dan lemak sebesar 89,28% untuk membersihkan perairan yang tercemar oleh minyak bumi, yang dapat berdampak pada kematian organisme laut. Oleh karena itu, penggunaan ODB 3 merupakan inovasi baru dalam pengembangan kandidat probiotik pada ikan. Untuk mengetahui bakteri yang ada pada suatu spesimen, dapat diidentifikasi dengan menggunakan metode isolasi bakteri. Prinsip dari isolasi bakteri yaitu suatu proses memisahkan atau memindahkan mikroba dari media atau dari lingkungan asalnya lalu menumbuhkannya di media buatan sehingga diperoleh biakan yang murni (Andhini *et al.*, 2018; Relatami *et al.*, 2023 dan Puspitasari *et al.*, 2020).

Berdasarkan hasil eksplorasi yang dilakukan oleh Relatami *et al.* (2023), di dapatkan terdapat 9 jenis ODB, salah satunya yaitu diberi nama ODB 3 dan melihat potensi dari bakteri tersebut dalam mendegradasi minyak di perairan sehingga dapat mencegah terjadinya pencemaran yang dapat berdampak pada kehidupan biota laut, maka dilakukan karakterisasi bakteri ODB 3 sebagai parameter layak atau tidaknya dijadikan sebagai kandidat bakteri probiotik pada ikan dengan menggunakan metode isolat bakteri, uji hemolisis, uji resistensi antibiotik, uji pH, uji salinitas, dan uji fermentasi karbohidrat.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan maka dapat diambil rumusan masalah yaitu bagaimana karakterisasi isolat bakteri *oil degradation bacteria* (ODB) 3 sebagai kandidat probiotik pada ikan?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui kandidat probiotik pada ikan dari karakterisasi bakteri *oil degradation bacteria* (ODB) 3.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

Untuk menentukan kandidat probiotik bakteri dari *oil degradation bacteria* (ODB) 3 berdasarkan karakteristiknya dengan metode isolasi bakteri ODB 3, uji hemolisis, uji resistensi antibiotik, uji pH, uji salinitas, dan uji fermentasi karbohidrat

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

### 1.4 Keaslian Penelitian

Publikasi penelitian mengenai Karakterisasi Isolat Bakteri *Oil Degradation Bacteria* (ODB) 3 Sebagai Kandidat Probiotik Pada Ikan belum pernah dilakukan. 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”.

### 1.5 Kajian Pustaka

#### 1.4.1 Oil Degradation (ODB)

*Oil degradation bacteria* (ODB) adalah mikroorganisme yang mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon dalam minyak bumi. Bakteri tersebut menggunakan senyawa hidrokarbon sebagai sumber karbon dan energi yang diperlukan untuk pertumbuhannya. Bakteri ini tersebar di alam, termasuk di dalam perairan atau sedimen tercemar minyak bumi. Secara alami, bakteri ini dapat mengikat, mengemulsi, mentranspor, dan mendegradasi minyak. Kemampuan bakteri ini dapat digunakan dalam proses bioremediasi untuk membersihkan lingkungan perairan yang tercemar oleh minyak bumi seperti, tumpahan minyak di perairan laut yang dapat menyebabkan konsekuensi serius bagi kehidupan biota di laut, mengakibatkan kerusakan pada lingkungan laut dan mengurangi kualitas ekosistem laut. Bakteri ini menghasilkan enzim oksigenase yang berperan dalam memecah senyawa organik kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana (Prakasita dan Wulansarie, 2018; Syafrizal *et al.*, 2020; Puspitasari *et al.*, 2020).

*Oil Degradation Bacteria* (ODB) adalah jenis bakteri yang memiliki kemampuan untuk memutuskan ikatan karbon yang terdapat dalam senyawa hidrokarbon yang seringkali bersifat berbahaya menjadi struktur

lain yang ramah lingkungan (Andhini *et al.*, 2018). ODB 3 merupakan salah satu nama kandidat bakteri hasil inovasi riset dari PT Depot Pengisian Pesawat Udara (DPPU) Pertamina Makassar dengan memanfaatkan kandidat mikroorganisme yang dapat digunakan untuk bioremediasi yang diambil dari sampel *oil catcher* DPPU.

#### 1.4.2 Probiotik

Probiotik adalah mikroba hidup yang mampu memberikan keuntungan bagi makhluk hidup dan memberikan pengaruh positif terhadap kesehatan yaitu dengan mengatur keseimbangan mikroba dalam saluran pencernaan, meningkatkan efisiensi dan pemanfaatan pakan, meningkatkan respon imun serta memperbaiki kualitas lingkungan dengan melepas enzim-enzim yang membantu proses pencernaan makanan. Probiotik memiliki kemampuan merangsang sistem pertahanan tubuh melawan penyakit atau meningkatkan kemampuan penyerapan usus sekaligus menekan populasi patogen (Umasugi *et al.*, 2018).

Probiotik mampu bertahan hidup dalam saluran pencernaan dan memberikan pertahanan untuk melawan bakteri patogen. Peran probiotik yaitu dapat menimbulkan lingkungan yang tidak nyaman untuk pertumbuhan bakteri patogen, dengan menghasilkan suasana asam pada saluran pencernaan. Senyawa-senyawa yang dihasilkan pada metabolisme bakteri probiotik seperti asam laktat, hidrogen peroksida, bakteriosin yaitu protein atau polipeptida yang bersifat antimikroba dan antibiotik mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen. Beberapa jenis bakteri yang dapat dijadikan sebagai probiotik, salah satunya adalah Bakteri Asam Laktat (BAL). BAL merupakan kelompok bakteri gram positif yang telah banyak digunakan sebagai probiotik (Datta, 2016; dan Andriani *et al.*, 2020).

#### 1.4.3 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) adalah jenis bakteri anaerob fakultatif yang dapat hidup di berbagai lingkungan, seperti tanaman, saluran pencernaan manusia dan hewan. Di dalam saluran pencernaan, BAL berkembang secara alami dan memberikan manfaat dengan menghambat pertumbuhan bakteri patogen di usus, serta merangsang sistem kekebalan tubuh. Salah satu peran utama BAL adalah menghasilkan asam organik yang dapat mencegah berkembangnya bakteri patogen di usus halus, serta menghasilkan senyawa antimikroba seperti bakteriosin. Bakteriosin yang diproduksi oleh BAL berupa protein yang bersifat bakterisidal. Kemampuan bakteriosin sebagai biopreservatif terbukti dari kemampuannya dalam menghambat mikroorganisme patogen (Rahmiati dan Mumpuni, 2017).

BAL adalah kelompok bakteri gram positif yang mampu mengfermentasi karbohidrat menjadi asam laktat sebagai produk utama. Biasanya, bakteri ini tidak membentuk spora dan dapat ditemukan dalam bentuk kokus atau

batang. Genus utama yang termasuk dalam kelompok ini adalah *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Streptococcus*. Di dalam saluran pencernaan, bakteri ini dapat menyeimbangkan mikroba dengan menurunkan pH lingkungan menjadi 3 hingga 4,5, yang menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk. Pada ikan, BAL membantu menyeimbangkan mikrobiota usus dengan cara mengubah karbohidrat menjadi asam laktat melalui proses enzimatik, yang menyebabkan penurunan pH. Hal ini dapat merangsang produksi zat-zat yang meningkatkan penyerapan nutrisi dan konsumsi pakan (Oktaviani *et al.*, 2021).

#### 1.4.4 Syarat Bakteri Sebagai Kandidat Probiotik Pada Ikan

Berdasarkan data yang telah ditetapkan oleh FAO tentang kriteria mikroorganisme probiotik, antara lain mikroorganisme mampu bertahan hidup pada kondisi asam lambung dan garam empedu pencernaan, memberikan manfaat bagi kesehatan usus, mampu melekat pada lapisan mukus dan sel epitel usus, memiliki kemampuan untuk menghasilkan aktivitas antimikroba yang dapat melawan bakteri patogen, merupakan mikroorganisme yang aman atau termasuk dalam kategori mikroorganisme GRAS (*generally recognized as safe*), tidak menghasilkan toksin, tidak menunjukkan resistensi terhadap antibiotik, dan bukan merupakan bakteri patogen (EFSA, 2012).

Syarat utama bakteri yang dapat berperan sebagai agen probiotik adalah tidak bersifat patogen dan memiliki kemampuan bertahan dalam proses pengawetan dan penyimpanan serta telah terbukti kemampuannya memberikan efek kesehatan yang positif. Saat memilih suatu mikroorganisme yang akan digunakan sebagai probiotik, terdapat beberapa persyaratan yang harus dimiliki oleh mikroba probiotik antara lain :

1. Mikroba probiotik tidak bersifat patogen atau mengganggu inangnya, serta tidak boleh bersifat patogen bagi konsumen manusia maupun hewan lainnya.
2. Mikroba tersebut tidak boleh mengganggu keseimbangan ekosistem lokal.
3. Mikroba probiotik harus mudah dipelihara dan diperbanyak.
4. Mikroba tersebut harus dapat bertahan, hidup, dan berkembang biak di dalam usus ikan.
5. Mikroba tersebut harus bisa dipelihara dalam media yang memungkinkan untuk diintroduksi ke dalam usus ikan.
6. Mikroba tersebut harus mampu hidup dan berkembang di dalam air wadah pemeliharaan ikan (Supriatna *et al.*, 2016 dan Sunaryanto *et al.*, 2014).

Berdasarkan data dari Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan Indonesia no.1 Tahun 2019 tentang klasifikasi obat ikan, sediaan probiotik pada ikan harus dihasilkan dari mikroba nonpatogenik yang secara alami ada dalam lingkungan air dan dalam tubuh ikan yang bekerja dengan proses bioremediasi, biokontrol saluran cerna dan sebagai penyaing bakteri patogen. Dan sediaan probiotik harus memenuhi ketentuan sebagai berikut:

1. Dalam satu sediaan maksimal mengandung 5 spesies mikroba dengan kepadatan masing-masing spesies minimal  $10^6$  cfu/ml atau  $10^6$  cfu/g;
2. Tidak boleh mengandung patogen;
3. Mikroba probiotik tidak boleh berasal dari negara atau negara transit yang terkena wabah penyakit ikan penting dan/atau penyakit ikan tertentu yang membahayakan, yang belum ada di wilayah Negara Kesatuan Republik Indonesia.

Penggunaan bakteri probiotik merupakan salah satu solusi internal untuk meningkatkan pertumbuhan dan efisiensi pakan yang optimal, mengurangi biaya produksi sehingga pada akhirnya dapat mengurangi beban lingkungan karena akumulasi limbah di media pemeliharaan. Selain itu, pemberian bakteri probiotik melalui pakan 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).

## **BAB II**

### **METODE PENELITIAN**

#### **2.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober-November 2024. Pengambilan isolat bakteri *Oil Degradation Bacteria* (ODB) 3 dari PT DPPU (Depot Pengisian Pesawat Udara) Pertamina Makassar. Kemudian, pemeriksaan sampel isolat dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin dan beberapa pengujian dilakukan 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 3 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*.

##### **2.3.2 Bahan**

Bahan penelitian yang digunakan adalah isolat bakteri ODB 3, alkohol, spiritus, plastik wrap, aluminium foil, *aquades*, antibiotik (cefoxitin-30µg), media *Nutrient Agar* (NA), *blood agar*, media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), media TSA (*Tryptone Soya Agar*), HCl, NaCl, kapas, darah domba, *microtube*, vortex, mikropipet tips.

#### **2.4 Metode Penelitian**

##### **2.4.1 Pengambilan Sampel Isolat Bakteri ODB 3**

Pengambilan sampel isolat bakteri melalui PT DPPU Pertamina Makassar yang telah diisolasi melalui *oil catcher* dan menjadi isolat murni dengan pemberian kode ODB 3.

##### **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 3**

Uji Isolasi dilakukan dengan cara mengambil sampel bakteri ODB 3 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 *nutrient agar* (NA). Media NA termasuk ke dalam media universal yang sering digunakan untuk menumbuhkan dan mengembangkan 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).

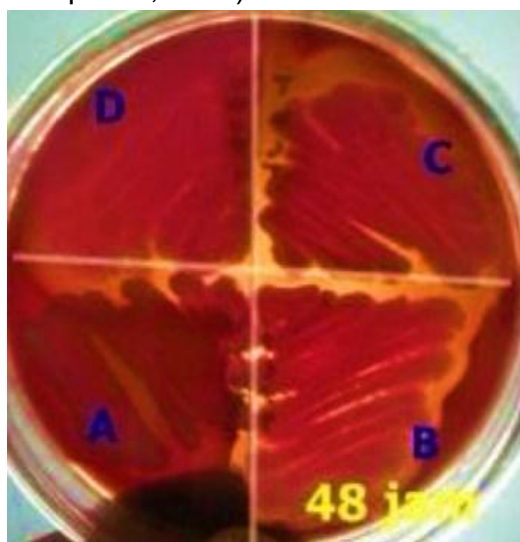


Gambar 2. 1 Contoh hasil isolasi bakteri menggunakan metode *streak plate* di media NA (Pakaya *et al.*, 2022).

#### 2.4.4 Uji Karakterisasi Isolat Bakteri ODB 3

##### 2.4.4.1 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 (Sodiq *et al.*, 2019).



Gambar 2. 2 Contoh hasil uji hemolisis positif (B,C,D) pada media Blood Agar (Manalu, 2017).

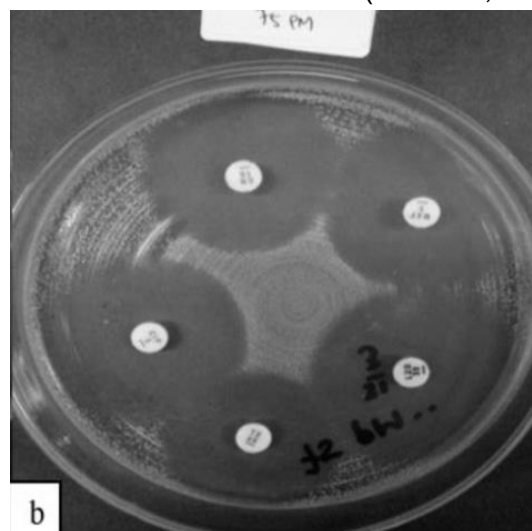
##### 2.4.4.2 Uji Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan gram dilakukan untuk melihat bentuk-bentuk sel bakteri dan untuk mengetahui golongan bakteri termasuk gram positif atau gram negatif. Uji perwarnaan 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.

#### 2.4.4.3 Uji Resistensi Antibiotik

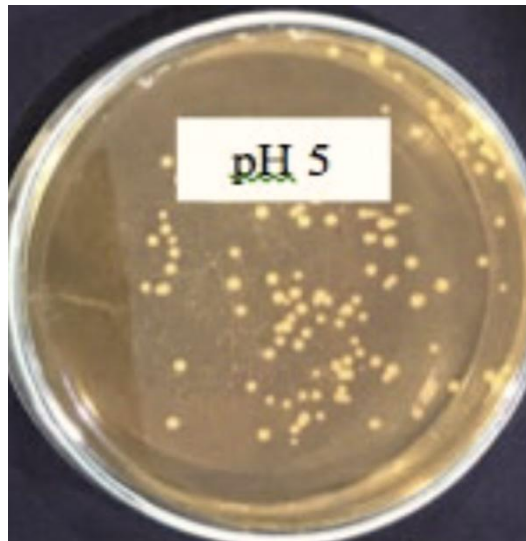
Uji resistensi antibiotik dapat dilakukan dengan metode *kirby-bauer*. Metode ini menggunakan kertas cakram (*paper disc*) dengan jenis antibiotik tertentu yang akan digunakan. Perbandingan kontrol negatif dapat menggunakan kertas cakram yang tidak mengandung antibiotik. Kertas cakram ditempatkan di atas media TSA yang sebelumnya diinokulasi secara merata dengan bakteri, kemudian diinkubasi selama 37°C selama 24 jam (Rahmadhaniah *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 2. 3 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 2. 4 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 2. 5 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 pembentukan gas terjadi di dasar media yang ditandai dengan adanya ruang kosong di dasar media (Kosasi *et al.*, 2019)



Gambar 2. 6 Uji Fermentasi Karbohidrat (Pelt *et al.*, 2016)

## 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 3 sebagai kandidat probiotik pada ikan dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk tabel.

## 2.6 Alur Penelitian



Gambar 2. 7 Alur Penelitian