

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Aktivitas penangkapan ikan mulai berkembang dan mengalami peningkatan produksi sebesar rata-rata 5% per tahun (Sangadji *et al.*, 2013). Dari tahun ke tahun produksi ikan baik di budidaya maupun perairan semakin meningkat, hal ini dapat menjelaskan untuk menghasilkan produksi yang baik dan berkualitas tinggi harus memperhatikan beberapa aspek seperti kualitas komoditi, keberlanjutan sumber daya, dan aspek keamanan serta kesehatan (Dwinafiah dan Hasan, 2023). Berfokus kepada aspek kesehatan, Menurut Nugroho *et al.* (2016), menyatakan bahwa salah satu kendala utama dalam keberlanjutan produksi budidaya perairan adalah infeksi mikroorganisme patogen dan degradasi lingkungan yang dapat menyebabkan kematian pada ikan. Kondisi ini dapat berdampak pada jumlah produksi, keuntungan, dan keberlanjutan sistem budidaya. Dilaporkan bahwa industri budidaya ikan di Indonesia telah mengalami setidaknya tiga kejadian wabah yang menyebabkan kerugian besar karena penyakit, baik itu disebabkan oleh parasit maupun bakteri yang bisa menyebabkan kematian massal (Suwarsito dan Mustafidah, 2011).

Kematian massal pada ikan dapat pula disebabkan oleh beragam faktor lainnya, termasuk rendahnya kadar oksigen terlarut, fluktuasi suhu perairan yang tiba-tiba, kehadiran parasit penyakit, dan polusi. Kematian ikan ini juga dapat mengakibatkan kerugian ekonomi yang besar serta memiliki dampak negatif pada struktur dan dinamika rantai makanan serta keseimbangan nutrisi di lingkungan perairan (Putri *et al.*, 2016). Untuk menekan kematian pada produksi budidaya ikan, maka dapat dilakukan pengobatan yang mudah serta cepat dilakukan yaitu dengan menggunakan zat kimia atau antibiotik (Un *et al.*, 2021).

Penggunaan antibiotik dalam jangka waktu yang panjang memiliki dampak negatif, termasuk kemungkinan timbulnya resistensi bakteri, biaya yang tinggi, dan potensi pencemaran lingkungan. Penggunaan antibiotik pada ikan yang ditujukan untuk konsumsi manusia dapat menyisakan residu di dalam tubuh ikan tersebut, yang kemudian dapat menjadi masalah keamanan pangan karena dapat menyebabkan resistensi bakteri yang bersifat infeksius bagi manusia. Maka dari itu, penggunaan antibiotik sangat ditekan baik oleh pemerintah bahkan para pelaku di bidangnya. Penyebab resistensi antibiotik adalah penggunaannya yang meluas dan dosis antibiotik yang tidak sesuai (Purba *et al.*, 2020). Alternatif lain yang dapat digunakan sebagai pengganti antibiotik yang paling sederhana ialah penggunaan probiotik.

Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang memberikan manfaat dengan meningkatkan populasi mikroba yang menguntungkan di saluran pencernaan, sehingga berkontribusi pada peningkatan kesehatan dan pertumbuhan ikan (Pangaribuan dan Sembiring, 2022). Probiotik juga dapat memberikan keuntungan bagi inang dengan mengatur keseimbangan mikroba dalam saluran

pencernaan, meningkatkan efisiensi dan pemanfaatan pakan, meningkatkan respon imun serta memperbaiki kualitas lingkungan. Ada beberapa jenis bakteri yang menguntungkan dan merugikan. Jenis bakteri menguntungkan telah dan sementara dikembangkan sebagai probiotik diantaranya Bakteri Asam Laktat (BAL) (Umasugi *et al.*, 2018). Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan salah satu bakteri yang memiliki peran penting dalam menjaga keseimbangan ekosistem. Bakteri ini secara umum termasuk ke dalam bakteri gram positif, katalase negatif, tidak membentuk spora, tidak mempunyai *cytochrome*, aerotoleran, anaerobik hingga mikroaerofilik (Febrianti *et al.*, 2016). Adapun contoh-contoh dari bakteri asam laktat yang dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik pada ikan yaitu *Lactobacillus*, *Pseudomonas* dan bakteri pendegradasi minyak atau *Oil Degrading Bacteria* (ODB) (Umasugi *et al.*, 2018).

Bakteri pendegradasi minyak atau *Oil Degrading Bacteria* (ODB) merupakan salah satu dari sekian banyak jenis bakteri yang dapat mendegradasi limbah minyak. ODB dapat ditemukan pada lingkungan yang telah mengalami pencemaran yang berkelanjutan dan di kolam pengolahan limbah, kemungkinan terdapat bakteri yang secara alami menguraikan minyak, baik bersaing maupun berkonsorsia dengan mikroorganisme lainnya (Andhini *et al.*, 2018). Kemampuan ODB dalam mendegradasi limbah minyak bersifat cukup berbahaya karena di dalam bakteri tersebut terkandung beberapa senyawa hidrokarbon dan dengan hal tersebut bakteri ini dapat membantu menemukan hal baru dalam pengembangan probiotik. Selain pendekatan fisika dan kimia yang umum digunakan, teknik bioremediasi dan isolasi bakteri juga dianggap sebagai alternatif yang menjanjikan (Darmayati, 2009). Isolasi bakteri memiliki prinsip yaitu memisahkan satu jenis mikroba atau bakteri dari lingkungan alami yang kemudian akan ditumbuhkan dalam suatu medium (Taib *et al.*, 2023)

Berdasarkan latar belakang yang telah jelaskan, maka peneliti kemudian melakukan eksplorasi isolat bakteri ODB 5 sebagai salah satu cara yang ditemukan pada *oil catcher* untuk melihat potensi sebagai bakteri probiotik. Maka dari itu, diperlukan pengamatan terhadap karakterisasi ODB 5 sebagai parameter layak atau tidaknya bakteri tersebut dijadikan sebagai kandidat probiotik pada ikan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan maka dapat diambil rumusan masalah yaitu bagaimana karakterisasi isolat *oil degradation bacteria* (ODB) 5 sebagai kandidat probiotik pada ikan.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandidat probiotik pada ikan dari karakterisasi *oil degradation bacteria* (ODB) 5.

1.3.2 Tujuan Khusus

Untuk menentukan kandidat probiotik dari *oil degradation bacteria* (ODB) 5 berdasarkan karakteristiknya dengan metode isolasi bakteri ODB 5, uji hemolisis, uji sensitivitas antibiotik, uji pH, uji salinitas dan uji fermentasi karbohidrat.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Pengembangan Ilmu

Manfaat pengembangan ilmu dari penelitian ini adalah sebagai tambahan pengetahuan dan literatur mengenai spesies bakteri yang terdapat pada *oil degradation bacteria* (ODB) 5 yang akan dikembangkan sebagai probiotik pada ikan.

1.4.2 Manfaat Aplikasi

Manfaat aplikasi pada penelitian ini untuk mengembangkan produk probiotik yang dapat digunakan pada beberapa hewan dan dapat digunakan pada pembudidayaan perikanan serta dapat menjadi rujukan bagi penelitian selanjutnya.

1.5 Keaslian Penelitian

Penelitian mengenai “Karakterisasi Isolat Bakteri *Oil Degradation Bacteria* (ODB) 5 Sebagai Kandidat Probiotik Pada Ikan” belum pernah dilakukan sebelumnya tetapi penelitian serupa pernah dilakukan.

Tabel 1. Keaslian Penelitian

Penulis	Judul
Yosmaniar <i>et al.</i> , 2017	Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Nitrifikasi Dan Denitrifikasi Sebagai Kandidat Probiotik

1.6 Tinjauan Pustaka

1.6.1 *Oil Degradation Bacteria* (ODB)

Menurut Kementerian Energi dan Sumber Daya Mineral Republik Indonesia (2011), menyatakan bahwa bakteri yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi senyawa yang terdapat dalam hidrokarbon minyak bumi disebut bakteri hidrokarbonoklastik. Bakteri ini mampu mengurai senyawa hidrokarbon dengan menggunakan mereka sebagai sumber karbon dan energi yang diperlukan untuk pertumbuhannya. Kemampuan bakteri ini untuk mengoksidasi hidrokarbon dan menggunakan mereka sebagai donor elektron memungkinkan mereka untuk memecah komponen-komponen minyak bumi. Dalam membersihkan tumpahan minyak, bakteri ini mengubah minyak bumi menjadi gas karbon dioksida (CO₂). Selain itu, mereka juga menghasilkan produk-produk biologis seperti asam lemak, gas, surfaktan, dan biopolimer, yang dapat meningkatkan porositas dan permeabilitas batuan reservoir formasi klastik dan karbonat saat mereka mendegradasi minyak bumi. Kemampuan dari bakteri ini dapat dijadikan untuk membersihkan lingkungan alamiah, salah satu caranya ialah bioremediasi.

Bioremediasi merupakan suatu proses di mana organisme seperti bakteri, *fungi*, tanaman, atau enzimnya digunakan untuk menguraikan limbah organik atau anorganik yang menjadi polutan dalam sampah organik. Proses ini dilakukan dalam kondisi terkontrol dengan tujuan mengurangi pencemaran lingkungan, baik dengan mengubahnya menjadi bahan yang tidak berbahaya atau mengurangi konsentrasinya hingga di bawah batas yang ditetapkan oleh lembaga berwenang. Ini bertujuan untuk mengontrol atau mengurangi jumlah bahan pencemar yang dilepaskan ke lingkungan (Puspitasari dan Khaeruddin, 2016).

Oil Degradation Bacteria (ODB) merupakan salah satu dari sekian banyak jenis bakteri yang dapat mendegradasi limbah minyak. ODB dapat ditemukan pada lingkungan yang telah mengalami pencemaran yang berkelanjutan dan di kolam pengolahan limbah, kemungkinan terdapat bakteri yang secara alami menguraikan minyak. ODB atau biasa disebut bakteri pendegradasi memiliki kemampuan untuk memutuskan rantai karbon yang nantinya di lingkungan, bakteri ini akan menguraikan zat-zat *toxic* seperti limbah minyak atau *oil catcher* (Andhini *et al.*, 2018).

Salah satu jenis dari *oil degradation bacteria* (ODB) atau bakteri pendegradasi minyak ialah ODB 5 yang merupakan satu diantara beberapa jenis kandidat bakteri yang telah dikembangkan sebagai hasil inovasi riset dari PT. Depot Pengisian Pesawat Udara (DPPU) Pertamina Makassar. Mikroorganisme yang dimanfaatkan sebagai kandidat probiotik ialah ODB 5 dan sampelnya diambil dari *oil cather* pada PT. DPPU Pertamina Makassar.

1.6.2 Probiotik

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang dapat memberikan manfaat bagi inangnya dengan mengatur keseimbangan mikroba dalam saluran pencernaan, meningkatkan efisiensi dan pemanfaatan pakan, serta memperbaiki respon imun dan kualitas lingkungan. Kemampuan probiotik termasuk merangsang sistem pertahanan tubuh terhadap penyakit atau meningkatkan penyerapan nutrisi dalam usus sambil menekan pertumbuhan populasi patogen. Probiotik dalam pakan dapat meningkatkan tingkat kelangsungan hidup ikan, yang diduga karena fungsi probiotik sebagai mikroorganisme hidup yang mampu mencegah penyakit. Manfaat probiotik pada ikan melibatkan fungsi protektif, di mana bakteri probiotik memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen dalam saluran pencernaan ikan. Selain itu, peningkatan sistem kekebalan tubuh ikan juga merupakan salah satu fungsi dari probiotik (Umasugi *et al.*, 2018).

Probiotik memiliki kemampuan untuk berkembang biak dengan cepat di saluran pencernaan, sehingga mampu bertahan hidup dalam jangka waktu yang lama. Penambahan probiotik yang lebih banyak pada ikan akan menyebabkan probiotik tersebut menempel pada lapisan mukosa usus dan memberikan manfaat pada tubuh ikan. Keuntungan menggunakan probiotik pada inang adalah dapat mengatur jumlah bakteri dalam saluran pencernaan dan menghasilkan asam laktat (*lactic acid*), dan meningkatkan efektivitas enzim serta pencernaan pakan (Aisyah *et al.*, 2022).

Di antara bakteri yang dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik salah satu contohnya yaitu Bakteri Asam Laktat (BAL). Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan salah satu bakteri yang memiliki peran penting dalam menjaga keseimbangan ekosistem. Bakteri ini secara umum termasuk ke dalam bakteri gram positif, katalase negatif, tidak membentuk spora, tidak mempunyai *cytochrome*, aerotoleran, anaerobik hingga mikroaerofilik (Febrianti *et al.*, 2016). Adapun contoh-contoh dari bakteri asam laktat yang dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik pada ikan yaitu *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, dan *Oil Degradating Bacteria* (ODB) (Umasugi *et al.*, 2018).

1.6.3 Syarat Bakteri Sebagai Kandidat Probiotik Pada Ikan

Menurut Kementerian Energi dan Sumber Daya Mineral Republik Indonesia (2010), Bakteri hidrokarbonoklastik diantaranya adalah *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Brevibacterium*, *Brevibacillus*, dan *Bacillus*. Bakteri-bakteri tersebut banyak tersebar di alam, termasuk dalam perairan atau sedimen yang tercemar oleh minyak bumi atau hidrokarbon. Kita hanya perlu mengisolasi bakteri hidrokarbonoklastik tersebut dari alam dan mengkulturkannya, selanjutnya kita bisa menggunakannya sebagai pengolah limbah minyak bumi yang efektif dan efisien, serta ramah lingkungan. Salah satu faktor yang perlu dipertimbangkan untuk menentukan potensi mikroba sebagai kultur probiotik adalah ketahanannya terhadap lingkungan yang asam. Bakteri probiotik harus mampu bertahan dan berkembang biak di dalam saluran pencernaan, yang akan menghadapi rintangan seperti tingkat keasaman tinggi dari lambung yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri probiotik. Selain itu, bakteri probiotik harus mampu bersaing dengan bakteri patogen enterik seperti *Aeromonas hydrophila* di dalam saluran pencernaan (Barus *et al.*, 2015).

Penggunaan bakteri probiotik merupakan salah satu cara internal untuk meningkatkan pertumbuhan dan efisiensi pakan secara optimal, serta mengurangi biaya produksi. Dengan demikian, hal ini dapat mengurangi dampak lingkungan akibat akumulasi limbah di lingkungan budidaya. Pemberian bakteri probiotik melalui pakan bertujuan untuk mendegradasi protein, lemak, dan karbohidrat. Selain itu, bakteri ini diharapkan dapat mencapai saluran pencernaan ikan untuk meningkatkan kemampuan pencernaan ikan terhadap pakan. Bakteri probiotik juga dapat mengatur lingkungan mikroba dalam usus ikan dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen dengan melepaskan enzim yang membantu dalam pencernaan makanan (Rahmawan *et al.*, 2014).

Tidak hanya bakteri yang mempunyai syarat sebagai kandidat, tetapi probiotik pun mempunyai syarat-syarat tertentu. Menurut Widyarningsih (2011), probiotik dapat membantu menghilangkan antigen yang masuk bersama makanan. Probiotik harus memenuhi beberapa kriteria agar menjadi efektif, adapun syarat-syaratnya sebagai berikut :

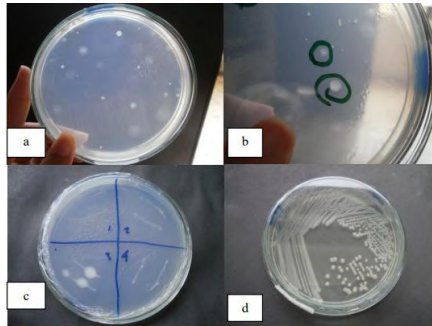
1. Probiotik harus memberikan manfaat yang positif bagi host dengan mengandung jumlah sel besar yang hidup dan dapat bertahan serta melakukan metabolisme di usus, sehingga memberikan dampak positif pada kehidupan mikroflora di sana.
2. Probiotik juga harus memiliki kemampuan untuk menempel pada sel epitel usus, membentuk kolonisasi di saluran pencernaan, menghasilkan zat anti-mikroba seperti bakteriosin.

1.6.4 Isolasi Bakteri

Bakteri secara alami tumbuh dalam populasi campuran yang terdiri dari berbagai spesies. Oleh karena itu, untuk mendapatkan kultur murni, sumber bakteri harus diolah dengan cara pengenceran agar hanya terdapat sekitar 100-200 bakteri yang ditransfer ke medium pertumbuhan. Hal ini memungkinkan pertumbuhan koloni yang berasal dari satu bakteri tunggal. Proses pemisahan atau pemurnian dari

bakteri lain perlu dilakukan karena setiap pekerjaan mikrobiologis memerlukan populasi mikroorganisme yang terdiri hanya dari satu jenis saja. Teknik ini dikenal sebagai isolasi bakteri. Ada beberapa cara untuk mengisolasi bakteri, seperti isolasi pada agar cawan, isolasi pada medium cair, dan isolasi sel tunggal (Wondal *et al.*, 2019).

Isolasi mikroorganisme adalah proses pengambilan mikroorganisme dari lingkungannya untuk kemudian dikulturkan dalam suatu media. Prinsip isolasi mikroba adalah untuk memisahkan satu jenis mikroba dari campuran mikroba lain yang ada dalam lingkungan tersebut. Beberapa faktor yang harus dipertimbangkan dalam melakukan isolasi mikroba termasuk sifat dari setiap jenis mikroba yang akan diisolasi, habitat atau asal mikroba, media pertumbuhan yang sesuai, teknik penginokulasian mikroba, metode penanaman mikroba, pengujian keberhasilan isolasi mikroba dalam bentuk kultur murni yang sesuai dengan tujuan isolasi, serta langkah-langkah untuk mempertahankan kemurnian kultur mikroba setelah diisolasi (Taib *et al.*, 2023).



Gambar 1. (a) Tahapan isolasi bakteri dengan menggunakan metode *streak plate*, (b-c) dan pemurnian, (d) hingga diperoleh isolat bakteri murni (Ed-har *et al.*, 2017).

Menurut Arini (2016), terdapat beberapa metode umum yang dapat dilakukan, yaitu metode goresan (*streak plate*), metode taburan atau tuang (*pour plate*), dan metode mikromanipulator (*the micromanipulator methods*). Secara alami, bakteri dalam lingkungan alam biasanya ditemukan dalam populasi campuran.

Pengembangbiakan Bakteri Dalam Cawan Petri Ada Beberapa Metode yaitu :

1. Metode Cawan Gores (*Streak Plate*)
Prinsip metode ini yaitu mendapatkan koloni yang benar-benar terpisah dari koloni yang lain, sehingga mempermudah proses isolasi. Cara ini dilakukan dengan membagi 3-4 cawan petri.
2. Metode Cawan Sebar (*Spread Plate*)
Teknik *spread plate* (lempeng sebar) adalah suatu teknik didalam menumbuhkan mikroorganisme didalam media agar dengan cara menuangkan stok kultur bakteri atau menghapusnya diatas media agar yang telah memadat.
3. Teknik Dilusi (Pengenceran)
Tujuan dari teknik ini adalah melarutkan atau melepaskan mikroba dari substratnya kedalam air, sehingga lebih mudah penanganannya. Sampel yang telah diambil kemudian disuspensikan dalam akuades steril. Hampir semua

metode penelitian dari penghitungan jumlah sel mikroba menggunakan teknik ini, seperti TPC (*Total Plate Counter*).

BAB II

METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober hingga November 2024. Pengambilan isolat bakteri *Oil Degradation Bacteria* (ODB) 5 dari PT DPPU (Depot Pengisian Pesawat Udara) Pertamina Makassar. Kemudian, pemeriksaan sampel isolat dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin dan 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 5 yang akan di karakterisasi.

2.3 Materi Penelitian

2.3.1 Alat

Alat penelitian yang digunakan adalah autoklaf, erlenmeyer, cawan petri, lampu bunsen, *hotplate*, gelas ukur, mikroskop, *object glass*, 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 5, alkohol, spiritus, plastik wrap, lugol, safranin, *aluminium foil*, aquades, antibiotik (*cefoxitin*), 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 Penelitian

2.4.1 Pengambilan Sampel Isolat Bakteri ODB 5

Pengambilan sampel isolat bakteri melalui PT DPPU Pertamina Makassar yang sebelumnya telah di isolasi melalui *oil catcher* oleh PT DPPU Pertamina Makassar dengan pemberian kode ODB 5.

2.4.2 Pembuatan Media

2.4.2.1 Media *Nutrient Agar* (NA)

Pembuatan media *nutrient agar* dilakukan dengan cara menimbang NA 2,8gr dan dilarutkan dalam 100 ml aquades, kemudian panaskan di atas *hotplate* hingga homogen. Setelah itu, disterilkan 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.

2.4.2.2 Media Blood Agar Base

Pembuatan media *blood agar base* dilakukan dengan menimbang 4gr masukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 100ml, 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 di defibrinasi sebanyak 7 ml lalu homogenkan.

2.4.2.3 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 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 Uji Isolasi Bakteri ODB 5

Uji Isolasi dilakukan dengan cara mengambil sampel bakteri ODB 5 dari media yang telah dimurnikan pada cawan petri, lalu di pindahkan 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 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 Uji Karakterisasi Isolat Bakteri ODB 5

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 di keliling koloni bakteri yang menunjukkan isolat bakteri berpotensi sebagai patogen dengan menghemolisis sel darah merah.

2.4.4.2 Uji Sensitifitas Antibiotik

Uji Sensitifitas 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.

2.4.4.3 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 dengan media TSA dan homogenkan. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri pada masing-masing media.

2.4.4.4 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 (*part per thousand*), dan 30 ppt (*part per thousand*) 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.

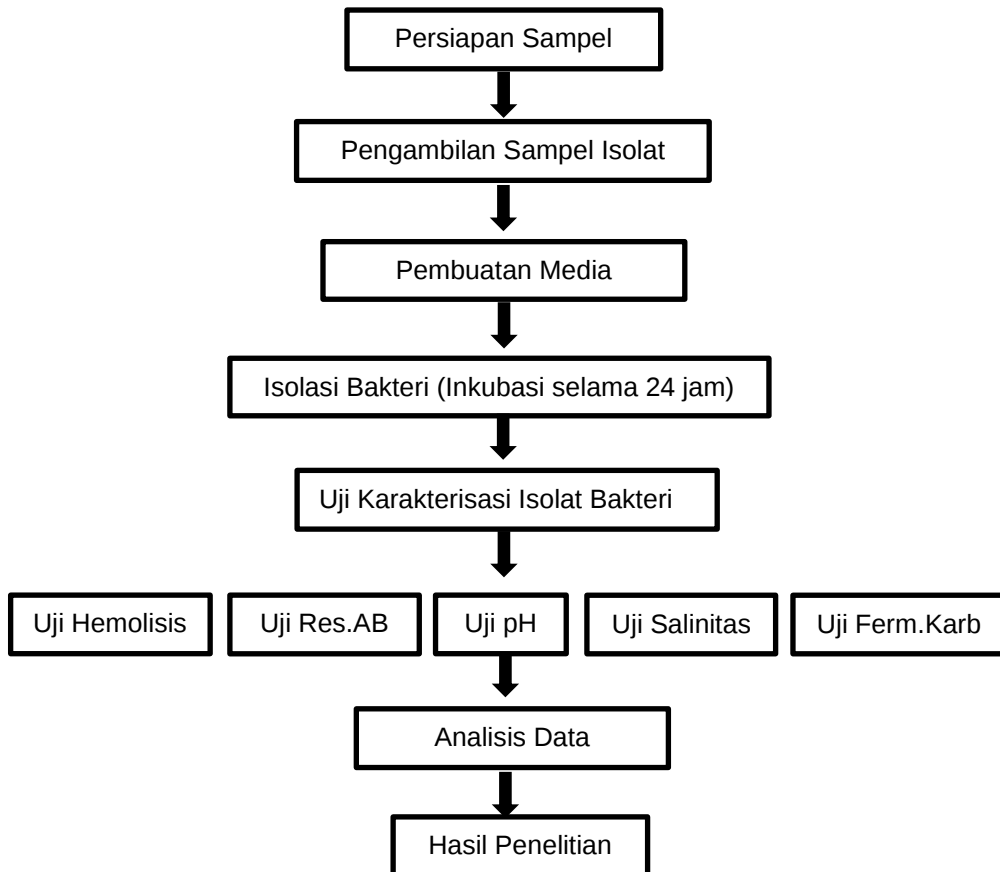
2.4.4.5 Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri yang dapat memfermentasi 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 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 5 sebagai kandidat probiotik pada ikan dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk tabel.

2.6 Alur Penelitian



Gambar 2. Alur Penelitian