

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI ISOLAT BAKTERI PROBIOTIK
YANG TERDAPAT PADA SALURAN PENCERNAAN IKAN LELE
(*Clarias sp*) TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus
aureus***

SKRIPSI



**UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A**

Disusun Oleh:

NADHIFAH AGUSTININGSIH

NIM: H71218025

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL
SURABAYA**

2023

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Nadhifah Agustiningsih

NIM : H71218025

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2018

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul: "AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI ISOLAT BAKTERI PROBIOTIK YANG TERDAPAT PADA SALURAN PENCERNAAN IKAN LELE (CLARIAS SP) TERHADAP BAKTERI ESCHERICHIA COLI DAN STAPHYLOCOCCUS AUREUS" Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 2023

Yang menyatakan,



Nadhifah Agustiningsih

NIM. H71218025

HALAMAN PERSETUJUAN

HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi

Aktivitas Antibakteri dari Isolat Bakteri Probiotik yang Terdapat pada Saluran Pencernaan Ikan Lele (*Clarias* sp) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Diajukan Oleh:

NADHIFAH AGUSTININGSIH

NIM: H71218025

Telah diperiksa dan disetujui

Di Surabaya, 2023

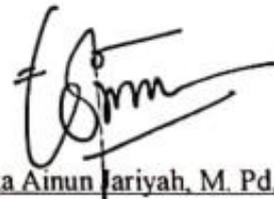
Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Kedua



Irul Hidayati, M. Kes

NIP. 198102282014032001



Ita Ainun Jariyah, M. Pd.

NIP. 198612052019032012

PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

HALAMAN PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Nadhifah Agustiningstih ini telah dipertahankan
di depan tim penguji skripsi
di Surabaya, 13 Januari 2023

Mengesahkan,
Dewan Penguji

Penguji I



Irul Hidayati, M. Kes

NIP. 198102282014032001

Penguji II



Ita Ainun Jarayah, M. Pd

NIP. 198612052019032012

Penguji III



Hanik Faizah, S. St., M. St

NIP. 201409019

Penguji IV



Risa Purnamasari, S. St., M. St

NIP. 201409002

Mengetahui,

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Sunan Ampel Surabaya



Dep Saepul Hamdani, M. Pd.

NIP. 196507312000031002

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI



**KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN**

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300
E-Mail: perpus@uinsby.ac.id

**LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Nadhifah Agustiningsih
NIM : H71218025
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/ Bologi
E-mail address : nadhifahagustiningsih98231@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

Skripsi Tesis Desertasi Lain-lain (.....)
yang berjudul :

AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI ISOLAT BAKTERI PROBIOTIK YANG TERDAPAT PADA SALURAN PENCERNAAN IKAN LELE (*Clarias sp*) TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus aureus*

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara *fulltext* untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 16 Januari 2023

Penulis

(Nadhifah Agustiningsih)

ABSTRAK

AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI ISOLAT BAKTERI PROBIOTIK YANG TERDAPAT PADA SALURAN PENCERNAAN IKAN LELE (*Clarias sp*) TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus aureus*

Bakteri probiotik merupakan suatu mikroba yang kehadirannya bersifat menguntungkan bagi sel inang yang mampu menyeimbangkan mikroflora dalam usus hingga menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Bakteri probiotik biasa dijumpai pada saluran pencernaan ikan, dan salah satu jenis ikan yang di dalam saluran pencernaannya terdapat bakteri probiotik adalah ikan lele (*Clarias sp*). Adapun penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui jenis bakteri probiotik yang terdapat pada saluran pencernaan ikan lele (*Clarias sp*) dan potensinya dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Identifikasi bakteri probiotik dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu pengamatan secara makroskopis, secara mikroskopis dan pengamatan berdasarkan karakteristik biokimia, juga dilakukan uji aktivitas amilolitik, proteolitik untuk melihat kemampuan dalam mendegradasi pati dan protein, terakhir dilakukan uji aktivitas antibakteri secara difusi dengan metode Kirby and Bauer dengan menggunakan kertas cakram atau paper disk. Dari hasil penelitian terdapat empat bakteri probiotik yang terdapat pada saluran pencernaan lele yang terduga berasal dari genus *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, dan *Bacillus*. Dari hasil uji aktivitas antibakteri, menunjukkan bahwa keempat bakteri probiotik mampu menghambat bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Adapun dari hasil pengukuran zona bening didapatkan hasil bahwa bakteri dari genus *Micrococcus* efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan bakteri dari genus *Bifidobacterium* efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Kata Kunci : Bakteri Probiotik, Saluran pencernaan ikan, Antibakteri, Daya hambat

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ISOLATE PROBIOTIC BACTERIA FOUND IN THE DIGESTIVE TRACT OF CATFISH (*Clarias* sp) AGAINST *Escherichia coli* AND *Staphylococcus aureus*

Probiotic bacteria are microbes whose presence is beneficial to host cells which are able to balance the microflora in the gut to inhibit the growth of pathogenic bacteria. Probiotic bacteria are commonly found in the digestive tract of fish, and one type of fish that has probiotic bacteria in its digestive tract is catfish (*Clarias* sp). This bacterial research was conducted with the aim of knowing the types of probiotics found in the digestive tract of catfish (*Clarias* sp) and their potential to inhibit *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria. Identification of probiotic bacteria was carried out through several stages, namely macroscopic, microscopic and observation based on biochemical characteristics, amylolytic and proteolytic activity tests were also carried out to see the ability to degrade starch and protein, and finally, antibacterial activity tests were carried out by diffusion with the Kirby and Bauer method using paper discs or paper discs. From the results of the study there were four probiotic bacteria found in the digestive tract of catfish which were thought to originate from the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, and *Bacillus*. From the results of the antibacterial bacterial activity test, it showed that the four probiotics were able to inhibit the test bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Meanwhile, from the results of clear zone measurements, it was found that bacteria from the genus *Micrococcus* were effective in inhibiting the growth of *Escherichia coli* bacteria and bacteria from the genus *Bifidobacterium* were effective in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* bacteria.

Keywords: Probiotic Bacteria, Digestive tract of fish, Antibacterial, Inhibition

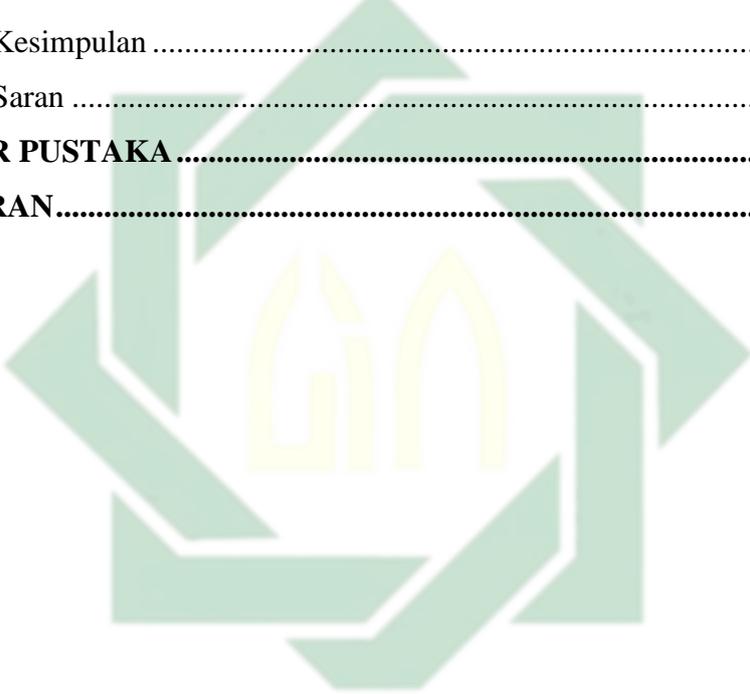
UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI	iv
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN	v
LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vi
MOTTO	vii
HALAMAN PERSEMBAHAN	viii
KATA PENGANTAR	ix
ABSTRAK	xi
ABSTRACT	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Batasan Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Ikan Lele (<i>Clarias sp</i>)	6
2.1.1 Klasifikasi Ikan Lele (<i>Clarias sp</i>)	6
2.1.2 Anatomi dan Morfologi Ikan Lele (<i>Clarias sp</i>)	6
2.1.3 Saluran Pencernaan Ikan Lele (<i>Clarias sp</i>).....	7
2.1.4 Habitat dan Perilaku Ikan Lele (<i>Clarias sp</i>).....	9
2.2 Bakteri Probiotik.....	9
2.3 Mekanisme Bakteri Probiotik	10
2.4 Jenis Bakteri Probiotik.....	11
2.4.1 <i>Lactobacillus casei</i>	11

2.4.2	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	12
2.4.3	<i>Streptococcus thermophilus</i>	12
2.4.4	<i>Micrococcus</i> sp.....	13
2.5	Definisi dan Jenis Bakteri Patogen	13
2.5.1	<i>Escherichia coli</i>	14
2.5.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.6	Antibakteri	15
2.7	Uji Aktivitas Antibakteri.....	17
2.8	Integrasi Keislaman Mengenai Bakteri.....	17
BAB III METODE PENELITIAN		19
3.1	Rancangan Penelitian.....	19
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian	20
3.3	Alat dan Bahan Penelitian.....	21
3.3.1	Alat.....	21
3.3.2	Bahan.....	21
3.4	Variabel Penelitian.....	21
3.5	Prosedur Penelitian	22
3.5.1	Pengambilan Sampel Ikan.....	22
3.5.2	Sterilisasi Alat	22
3.5.3	Pembuatan Media.....	22
3.5.4	Pembuatan Larutan Garam Fisiologis (NaCl 0,85%)	25
3.5.5	Persiapan Sampel	25
3.5.6	Isolasi Bakteri Probiotik.....	25
3.5.7	Identifikasi Bakteri.....	26
3.5.8	Uji Probiotik Bakteri	29
3.5.9	Uji Daya Hambat Bakteri Probiotik Terhadap Bakteri Patogen <i>Escherichia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>	30
3.6	Analisis Data.....	32
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		33
4.1	Hasil Isolasi Bakteri	33
4.2	Identifikasi Bakteri.....	34
4.2.1	Morfologi Secara Makroskopis.....	34

4.2.2 Morfologi Secara Mikroskopis	36
4.2.3 Karakteristik Biokimia	39
4.2.4 Hasil Uji Aktivitas Amilolitik	48
4.2.5 Hasil Uji Aktivitas Proteolitik.....	50
4.3 Penentuan Genus Bakteri Probiotik	51
4.4 Daya Hambat Bakteri Probiotik Terhadap Bakteri <i>Escherichia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>	58
BAB V PENUTUP.....	67
5.1 Kesimpulan	67
5.2 Saran	67
DAFTAR PUSTAKA	68
LAMPIRAN.....	76



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Tabel Rancangan Penelitian.....	20
Tabel 3.2 Jadwal Pelaksanaan Penelitian.....	20
Tabel 4.1 Tingkat pengenceran yang ditumbuhi bakteri.....	33
Tabel 4.2 Morfologi Koloni Bakteri secara Makroskopis	35
Tabel 4.3 Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri secara Mikroskopis	36
Tabel 4.4 Hasil Uji Biokimia	40
Tabel 4.5 Hasil Uji TSIA (<i>Triple Sugar Iron Agar</i>)	41
Tabel 4.6 Hasil Uji Simmon Citrat	42
Tabel 4.7 Hasil Uji Motilitas.....	44
Tabel 4.8 Hasil Uji MR (<i>Methyl Red</i>).....	45
Tabel 4.9 Hasil Uji VP (<i>Voges Proskauer</i>).....	46
Tabel 4.10 Hasil Uji Katalase	47
Tabel 4.11 Hasil Uji Aktivitas Amilolitik.....	49
Tabel 4.12 Hasil Uji Aktivitas Proteolitik.....	50
Tabel 4.13 Perbandingan isolat kode I1A dengan bakteri <i>Bifidobacterium</i>	53
Tabel 4.14 Perbandingan isolat kode I2A dengan bakteri <i>Lactobacillus</i>	55
Tabel 4.15 Perbandingan isolat kode I1B dengan bakteri <i>Micrococcus</i>	56
Tabel 4.16 Perbandingan isolat kode I2B dengan bakteri <i>Bacilus</i>	58
Tabel 4.17 Hasil pengukuran diameter zona hambat bakteri probiotik terhadap Bakteri uji.....	60
Tabel 4.18 Hasil uji normalitas	60
Tabel 4.19 Hasil uji Kruskal Wallis	61

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Ikan Lele (<i>Clarias</i> sp)	6
Gambar 2. 2 <i>Lactobacillus casei</i>	12
Gambar 2. 3 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	12
Gambar 2. 4 <i>Streptococcus thermophilus</i>	13
Gambar 4. 1 Morfologi bakteri secara makroskopis	35
Gambar 4. 2 Morfologi bakteri secara mikroskopis	37
Gambar 4. 3 Hasil uji biokimia TSIA	41
Gambar 4. 4 Hasil uji biokimia Simmon citrat	42
Gambar 4. 5 Hasil uji motilitas	43
Gambar 4. 6 Hasil uji MR	44
Gambar 4. 7 Hasil uji VP	46
Gambar 4. 8 Hasil uji Katalase	47
Gambar 4. 9 Uji aktivitas amilolitik	49
Gambar 4. 10 Uji aktivitas proteolitik	51
Gambar 4. 11 Daya hambat bakteri probiotik terhadap bakteri <i>E. coli</i>	59
Gambar 4. 12 Daya hambat bakteri probiotik terhadap bakteri <i>S. aureus</i>	59

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kegiatan Penelitian	76
Lampiran 2. Bahan Penelitian	78
Lampiran 3. Alat Penelitian	79
Lampiran 4. Pembuatan Reagen	80
Lampiran 5. Hasil uji normalitas daya hambat bakteri probiotik.....	81
Lampiran 6. Hasil uji Kruskal Wallis	82



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri probiotik merupakan suatu mikroba yang kehadirannya bersifat menguntungkan bagi sel inang dan dipercaya mampu menyeimbangkan mikroflora dalam usus. Istilah “*probiotik*” pertama kali diperkenalkan oleh Lilly dan Stillwell pada tahun 1965 yang diartikan sebagai mikroba stimulant atau nama bahan yang diproduksi oleh mikroba untuk mendorong mikroba lain. Berdasarkan WHO (*World Health Organization*) dan FAO (*Food And Agriculture Organization*) probiotik merupakan suatu mikroorganisme baik yang hidup pada tubuh inang dan memberikan manfaat yang menguntungkan bagi inang. Mikroorganisme yang bersifat probiotik memiliki beberapa kriteria salah satunya adalah toleran terhadap garam empedu, tahan terhadap kondisi asam, dan mampu menghambat bakteri patogen (Short, 1999) selain itu bakteri yang berpotensi sebagai probiotik memiliki beberapa ciri seperti, mampu bermetabolisme dan tumbuh dengan baik pada saluran pencernaan usus inang, serta efisien dalam menghasilkan asam organik. Mikroorganisme probiotik memiliki berbagai macam manfaat bagi tubuh seperti meningkatkan kekebalan tubuh, menjaga kesehatan saluran pencernaan, memproduksi vitamin, sebagai pengobatan penyakit diare, pengobatan dan pencegahan alergi, serta mampu memproduksi senyawa antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Maleki dkk., 2015).

Dalam perspektif Islam, terdapat beberapa ayat Al-Qur’an yang menjelaskan perihal berbagai macam ciptaan Allah SWT yang memiliki berbagai bentuk, seperti pada Surah Al Baqarah ayat 26 yang berbunyi

﴿ إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا ۗ ﴾

Artinya: *Sesungguhnya Allah tidak segan membuat perumpamaan seekor nyamuk atau yang lebih kecil dari itu.*

Dari potongan ayat yang berbunyi “*fama fauqoha*” yang memiliki arti lebih kecil dari itu, dapat diartikan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu dengan berbagai macam bentuk dari yang berukuran kecil layaknya nyamuk,

hingga ciptaan Allah yang memiliki ukuran lebih kecil dibandingkan nyamuk seperti mikroorganisme. Said meriwayatkan dari Qatadah bahwa Allah tidak segan menggunakan nyamuk ataupun organisme lain yang lebih sebagai perumpamaan, dan sesungguhnya Allah tidak segan menunjukkan kebenaran yang menyebutkan bahwa terdapat sesuatu hal baik yang memiliki ukuran kecil ataupun besar. Mikroorganisme merupakan organisme prokariotik dan uniseluler yang berukuran mikroskopis yang hanya dapat dilihat melalui alat bantu, seperti mikroskop. Mikroorganisme adalah organisme uniseluler yang kehadirannya tersebar luas dibandingkan makhluk hidup lain dan memiliki berbagai macam jenis baik dari segi ukuran, bentuk, tempat hidup, hingga sifat mikroorganisme yang menguntungkan dan merugikan. Hal tersebut sangat erat kaitannya dengan bakteri probiotik yang kehadirannya memiliki berbagai macam keuntungan salah satunya kemampuannya menghasilkan senyawa antibakteri yang dapat menyebabkan terhambatnya bakteri patogen yang merugikan .

Senyawa antibakteri merupakan suatu senyawa yang digunakan untuk membasmi pertumbuhan mikroba yang bersifat merugikan, Berdasarkan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri, senyawa antibakteri memiliki beberapa mekanisme seperti merusak dinding sel bakteri, merubah permeabilitas dari membran sitoplasma, menghambat kerja enzim, menghambat sintesis protein dan asam nukleat. Adapun beberapa jenis senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh mikroorganisme probiotik yang digunakan dalam menghambat bakteri patogen meliputi, berbagai jenis asam organik seperti asam asetat dan laktat, diasetil, hidrogen peroksida juga senyawa bakteriosin seperti polipeptida ataupun protein (Kasi dkk., 2017).

Bakteri probiotik biasa dijumpai pada anggota tubuh seperti saluran pencernaan manusia ataupun hewan darat atau air seperti ikan. Bakteri probiotik ini mampu berasosiasi didalam saluran pencernaan, untuk menstabilkan flora normal dalam saluran pencernaan. Saluran pencernaan ikan merupakan salah satu organ yang didalamnya terkandung bakteri probiotik. adanya bakteri probiotik dalam saluran pencernaan ikan, memiliki berbagai macam manfaat bagi ikan salah satunya untuk bertahan dari

serangan bakteri patogen ataupun penyakit. Salah satu jenis ikan yang didalam saluran pencernaanya terdapat bakteri probiotik adalah ikan lele (*Clarias sp*). Ikan ini memiliki daya tahan tubuh yang kuat, dan mampu hidup pada kondisi perairan dengan kualitas yang buruk. Berdasarkan penelitian (Manopo, *et al.*, 2019) dalam saluran pencernaan ikan lele terdapat beberapa strain bakteri probiotik seperti *Lactobacillus sp*, juga beberapa jenis bakteri probiotik yang tergolong dalam genus *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* (Kurniasih *dkk*, 2014).

Penelitian mengenai adanya bakteri probiotik dalam saluran pencernaan ikan dan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen telah dibuktikan melalui beberapa jenis ikan seperti ikan mujahir (*Oreochromis mossambicus*) dan rohu (*Labeo rohita*) (Seerengaraj *et al.*, 2016) dari hasil penelitian tersebut terdapat beberapa jenis strain bakteri probiotik yang terdapat pada saluran pencernaan sampel ikan, seperti strain bakteri dari genus *Lactobacillus sp*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium* dan *Streptococcus sp* yang menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen *Vibrio herveyii* dan *Vibrio parahemolyticus* (Seerengaraj *et al.*, 2016) Dari latar belakang tersebut, dilakukan penelitian mengenai bakteri probiotik yang terdapat pada saluran pencernaan ikan lele (*Clarias sp*) dan potensinya dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen penyebab penyakit pada manusia seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang diatas dapat dirumuskan beberapa rumusan masalah sebagai berikut :

1. Bagaimana aktivitas antibakteri dari isolat bakteri probiotik dari saluran pencernaan usus dan lambung terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*
2. Bagaimana aktivitas antibakteri dari isolat bakteri probiotik dari saluran pencernaan usus dan lambung terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini antara lain

1. Untuk mengetahui jenis bakteri berpotensi probiotik yang terdapat pada saluran pencernaan ikan lele (*Clarias* sp)
2. Untuk mengetahui apakah bakteri probiotik yang terdapat pada saluran pencernaan ikan lele (*Clarias* sp) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*
3. Untuk mengetahui apakah bakteri probiotik yang terdapat pada saluran pencernaan ikan lele (*Clarias* sp) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

1.4 Manfaat Penelitian

Adanya kegiatan penelitian ini diharapkan pembaca ataupun penulis dapat memperoleh manfaat, seperti

1. Memperoleh informasi, pengetahuan mengenai potensi bakteri probiotik yang terdapat pada saluran pencernaan ikan lele dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.
2. Memperoleh referensi ataupun acuan pengembangan pengaplikasian mengenai bakteri probiotik sebagai langkah untuk pengendalian penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*
3. Memperoleh referensi ataupun acuan pengembangan pengaplikasian mengenai bakteri probiotik sebagai langkah untuk pengendalian penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli*.

1.5 Batasan Penelitian

Batasan masalah dalam penelitian ini, antara lain.

1. Bakteri probiotik pada penelitian ini diperoleh dari lambung dan usus ikan lele (*Clarias* sp)
2. Parameter yang diamati meliputi, karakteristik makroskopis, mikroskopis dan biokimia, uji probiotik yang terdiri dari uji aktivitas amilolitik dan proteolitik, uji daya hambat bakteri probiotik dalam menghambat bakteri

patogen dengan menghitung ukuran diameter zona hambat.

3. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*
4. Uji daya hambat bakteri probiotik yang berhasil diisolasi terhadap bakteri patogen dilakukan menggunakan kertas cakram.

1.6 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian adalah terdapat perbedaan aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh bakteri probiotik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*.



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

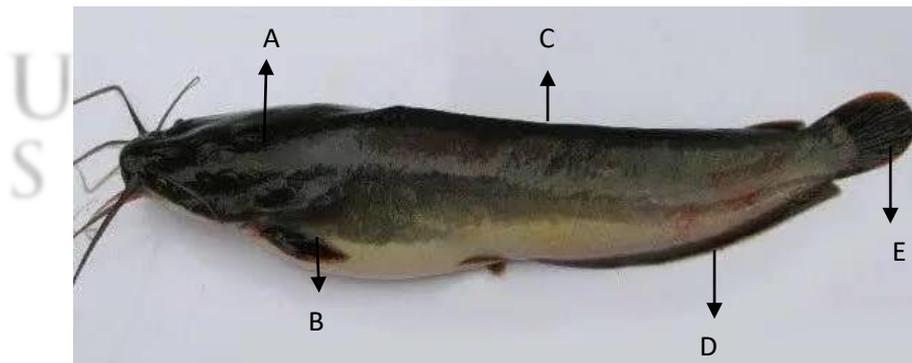
2.1 Ikan Lele (*Clarias sp*)

2.1.1 Klasifikasi Ikan Lele (*Clarias sp*)

Berdasarkan Sanin (1984) Ikan Lele diklasifikasikan sebagai berikut

Kingdom : Animalia
Sub Kingdom : Metazoa
Filum : Chordata
Sub Filum : Vertebrata
Kelas : Pisces
Ordo : Ostariophysi
Sub Ordo : Siluroidea
Famili : Clariidae
Genus : *Clarias*
Spesies : *Clarias sp*

2.1.2 Anatomi dan Morfologi Ikan Lele (*Clarias sp*)



Gambar 2. 1 Ikan Lele (*Clarias sp*). Keterangan; A= Kepala, B= Sirip dada, C= sirip punggung, D= Sirip dubur, E= Ekor (Dokumentasi: Pribadi, 2022)

Ikan lele merupakan salah satu jenis ikan yang hidup di air tawar dan tergolong dalam komoditas perikanan yang bernilai ekonomi tinggi. Ikan lele termasuk dalam ikan yang memiliki berbagai kelebihan untuk

dibudidayakan, seperti pertumbuhannya yang relatif cepat, mampu beradaptasi di berbagai lingkungan, mampu hidup pada kondisi perairan yang berkualitas rendah, dan memiliki cita rasa yang lezat dan mengandung gizi yang tinggi (Suyanto, 2006). Secara morfologi, ikan lele memiliki bentuk tubuh memanjang pipih, kulit tubuh yang tidak memiliki sisik, licin dan berlendir. Umumnya ikan lele berwarna hitam ke abuan pada bagian kepala berbentuk pipih dan dilengkapi dengan empat pasang kumis sebagai alat peraba. Ikan lele memiliki sirip dada yang dilengkapi dengan patil atau sepasang duri tajam yang penjangnya sekitar 40mm. selain itu ikan lele memiliki sirip punggung, sirip dada, sirip perut dan 4 pasang sungut, memiliki gigi yang terletak menempel pada rahang dan berbentuk viliform (Rahardjo dan muniarti, 1984). Secara anatomi, ikan lele (*Clarias* sp) memiliki alat pernapasan khusus yang dikenal dengan absorscen yang terletak di sisi kanan diatas insang yang difungsikan sebagai sarana pengambilan udara. Pada anggota tubuh ikan lele terdapat sebuah gonad yang memiliki karakteristik berbeda antara gonad ikan jantan dan betina. Pada ikan lele jantan cenderung memiliki warna gonad yang gelap, bagian sisi bergerigi dan memiliki ukuran lebih kecil dibandingkan betina. Sedangkan pada lele betina cenderung memiliki gonad yang berwarna lebih terang, terdapat bintik telur, dan memiliki bagian sisi yang tidak bergerigi, adapun anggota organ lain pada ikan lele, seperti jantung, empedu, hati, lambung dan usus.

2.1.3 Saluran Pencernaan Ikan Lele (*Clarias* sp)

Saluran pencernaan merupakan suatu sistem organ yang memiliki fungsi sebagai penerima makanan, mencerna makanan menjadi nutrient, tempat penyerapan zat yang dibutuhkan oleh tubuh, hingga tempat untuk mengeluarkan zat-zat sisa yang tidak dibutuhkan oleh tubuh melalui dubur. Adapun beberapa jenis organ yang termasuk dalam saluran seperti berikut.

a.) Mulut

Mulut merupakan salah satu organ pencernaan yang terletak di depan dalam saluran pencernaan. Mulut ikan berfungsi sebagai penerima makanan dan tempat jalan masuknya makanan. Mulut memiliki lendir yang dihasilkan dari sel kelenjar epitel mulut, lendir yang tercampur dengan makanan yang masuk dapat mempermudah proses penelanan makanan dengan bantuan kontraksi pada otot dinding mulut (Andi, 2021).

b.) Esophagus

Esophagus merupakan organ pencernaan yang terletak dibagian belakang di dekat insang. Esophagus pada ikan memiliki fungsi sebagai penghubung dalam mengarahkan makanan ke dalam lambung, esophagus atau yang biasa dikenal dengan kerongkongan memiliki pinggiran yang disebut epithelium yang dilengkapi dengan kelenjar lendir untuk mempermudah makanan yang telah tercerna dapat tersalurkan.

c.) Lambung

Lambung merupakan organ saluran pencernaan lanjutan setelah esophagus. Organ lambung berfungsi sebagai organ yang menyimpan makanan dan mencerna makanan. Lambung ikan memiliki berbagai macam bentuk. Pada lambung ikan pemakan ikan cenderung memiliki bentuk lambung yang panjang, pada ikan omnivora cenderung memiliki bentuk lambung yang menyerupai kantung. Pada organ saluran pencernaan, lambung dicirikan sebagai organ yang cenderung memiliki pH rendah (Andi, 2021).

d.) Usus

Usus merupakan organ pencernaan yang memiliki fungsi sebagai tempat penyerapan kebutuhan nutrisi yang diperlukan ikan. Secara umum, usus memiliki bentuk menyerupai pipa, berbentuk memanjang dan berkelok.

Usus ikan memiliki berbagai macam bentuk sesuai dengan kebiasaan makan. Pada ikan jenis karnivora seperti ikan lele cenderung memiliki bentuk usus yang lebih pendek dibandingkan dengan ikan herbivora (Shobikhuliatul dan Imelda, 2018).

2.1.4 Habitat dan Perilaku Ikan Lele (*Clarias* sp)

Habitat utama Ikan lele adalah semua perairan tawar, Misalnya sungai yang tidak berarus deras, di lingkungan yang kondisi perairannya tenang seperti waduk, telaga, rawa, danau serta kolam. Ikan lele mampu hidup pada kondisi perairan yang minim oksigen hal tersebut dikarenakan adanya organ insang tambahan yang digunakan ikan ini untuk mengambil oksigen dari udara. Ikan lele ini termasuk golongan ikan yang resisten terhadap bahan pencemar. Hal tersebut dibuktikan dengan kemampuan ikan lele tetap hidup di air buangan, lumpur atau comberan yang kondisi airnya kotor (Billah, 2020).

Berdasarkan kondisi lingkungannya, Ikan lele mampu hidup dengan baik pada wilayah dataran rendah hingga dataran yang tidak terlalu tinggi. Apabila lele dibudidayakan didaerah dataran tinggi yang memiliki suhu terlalu dingin maka pertumbuhan lele dapat menjadi lambat (Suyanto 2004). adapun suhu air yang disarankan dan optimal saat membudidayakan lele berkisar 25-27°C. Ikan lele termasuk golongan ikan yang bersifat *nocturnal*, yang lebih aktif beraktifitas dan mencari makan di malam hari dibandingkan di siang hari. Pada saat siang hari ikan lele cenderung berdiam di tempat gelap dan teduh. Pakan alami ikan lele adalah jentik jentik, cacing, kutu air, ataupun serangga, selain itu lele dapat memakan jenis kotoran dan segala sesuatu yang ada didalam lingkungan perairan yang ditempati (Murhananto, 2002).

2.2 Bakteri Probiotik

Bakteri probiotik, merupakan suatu mikroba yang kehadirannya bersifat menguntungkan bagi sel inang dan dipercaya mampu menyeimbangkan mikroflora dalam usus (Fuller, 1992) serta berpengaruh baik terhadap

fisiologi dan kesehatan inangnya. Istilah “*probiotik*” pertama kali diperkenalkan oleh Lilly dan Stillwell pada tahun 1965 yang diartikan sebagai mikroba stimulant atau nama bahan yang diproduksi oleh mikroba untuk mendorong mikroba lain. Berdasarkan WHO (*World Health Organization*) dan FAO (*Food And Agriculture Organization*) probiotik merupakan suatu mikroorganisme baik yang hidup pada tubuh inang dan memberikan manfaat yang menguntungkan bagi inang. Berdasarkan Fuller (1992) beranggapan jika probiotik ini bersifat menguntungkan karena kemampuannya dalam menghambat koloni mikroba yang bersifat patogen, dengan beberapa mekanisme seperti kompetisi nutrien, kompetisi ruang bahkan melalui kemampuannya dalam memproduksi senyawa antimikroba yang dimilikinya. Dalam bidang peternakan dan akuakultur penggunaan bakteri probiotik seringkali diaplikasikan sebagai bahan tambahan pakan, sedangkan dalam bidang akuakultur probiotik didefinisikan sebagai mikroba menguntungkan yang hidup dan mampu menjalin simbiosis antara mikroba dan inangnya untuk meningkatkan sistem pencernaan, meningkatkan kondisi perairan, mendorong respon inang terhadap virus ataupun patogen yang menyebabkan penyakit (Verschuere, 2000).

2.3 Mekanisme Bakteri Probiotik

Bakteri probiotik merupakan bakteri yang mampu mempertahankan keseimbangan dalam usus. Berdasarkan kemampuannya tersebut bakteri probiotik memiliki mekanisme kerja yaitu mendesak keluar bakteri non indigenous atau bakteri asing yang masuk dalam saluran pencernaan serta menggantikan posisi bakteri asing di dalam saluran pencernaan. Berdasarkan Verschuere et al (2000) memaparkan bahwa bakteri probiotik menerapkan beberapa mekanisme kerja diantaranya yaitu memproduksi senyawa penghambat, meningkatkan respon imunitas, dan kompetisi nutrisi. Berdasarkan Irianto (2003) memaparkan bahwa pada dasarnya, probiotik memiliki 3 mekanisme kerja yaitu (1) menekan pertumbuhan mikroba, sehingga dapat bersaing dan menghasilkan lebih banyak senyawa antimikroba (2) merubah proses metabolisme microbial dengan cara meningkatkan

ataupun menurunkan enzim (3) meningkatkan imunitas dengan menghasilkan antibodi ataupun aktivitas dari makrofag.

Bakteri probiotik mampu memperbaiki dan melindungi inangnya dari serangan bakteri asing, kemampuan bakteri probiotik dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang bersifat patogen dapat dilakukan dengan beberapa cara dibawah ini (Simadabrta, 2010)

1. Menghasilkan zat penghambat seperti bakteriosin, hydrogen peroksida (H_2O_2), reuterin dan asam organik seperti asam asetat dan asam laktat yang dapat menghambat tumbuhnya bakteri patogen baik bakteri gram negatif ataupun gram positif.
2. Meningkatkan pertumbuhan bakteri probiotik sehingga mampu berkompetisi dalam memperebutkan nutrisi yang masuk dalam saluran pencernaan
3. Menghambat invasi bakteri patogen dengan menempati permukaan mukosa saluran cerna atau tempat pelekatan bakteri patogen.

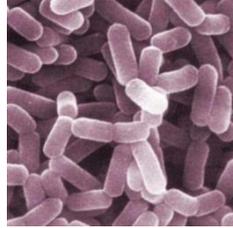
2.4 Jenis Bakteri Probiotik

Mikroorganisme yang bersifat probiotik memiliki beberapa kriteria salah satunya adalah tidak bersifat patogen, toleran terhadap garam empedu dan asam (Short, 1999). selain itu bakteri yang berpotensi sebagai probiotik memiliki beberapa ciri seperti, mampu bermetabolisme dan tumbuh dengan baik pada saluran pencernaan usus inang, efisien dalam menghasilkan asam organik. Adapun beberapa jenis mikroorganisme yang berpotensi probiotik seperti berikut.

2.4.1 *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei merupakan bakteri yang mampu memfermentasi glukosa menjadi asam laktat. Selain menghasilkan asam laktat, bakteri jenis ini mampu menghasilkan asetaldehid, malat, asam sitrat, asetoin dan diasetil. Secara Morfologi bakteri *Lactobacillus casei* merupakan bakteri gram positif yang berbentuk batang pendek, tidak memiliki flagella, katalase negatif, dan dapat tumbuh dalam kondisi

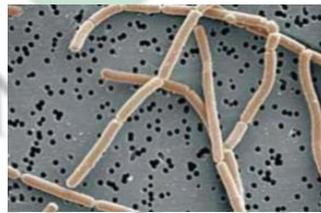
anaerob fakultatif. Bakteri jenis ini termasuk dalam jenis bakteri mesofil yang hidup dengan optimum pada kondisi suhu 27 °C dengan kadar pH 6,8 (Tambunan, 2016).



Gambar 2. 2 *Lactobacillus casei*
(Tabunan, 2016)

2.4.2 *Lactobacillus bulgaricus*

Lactobacillus bulgaricus merupakan salah satu jenis bakteri asam laktat yang banyak tersebar di berbagai produk sayur dan hewan. bakteri yang tergolong jenis gram positif ini memiliki bentuk batang, tidak memproduksi indol dan H²S, tidak dapat membentuk endospora, dan dapat tumbuh optimum pada suhu 37 °C, bersifat termodurik atau dapat bertahan hidup pada kondisi temperatur tinggi. Berdasarkan kebutuhan oksigennya, bakteri jenis ini tergolong dalam bakteri anaerob fakultatif yaitu bakteri yang dapat hidup dengan atau adanya oksigen (Buckle, et al, 2007).

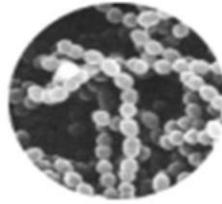


Gambar 2. 3 *Lactobacillus bulgaricus*
(Tabunan, 2016)

2.4.3 *Streptococcus thermophilus*

Bakteri *Streptococcus thermophilus* adalah bakteri gram positif yang dapat tumbuh optimal pada suhu 45 °C. Secara morfologi bakteri *Streptococcus thermophilus* berbentuk bulat rantai, tidak berspora, mampu mereduksi litmusmilk, tergolong dalam bakteri yang bersifat termodurik atau tahan terhadap temperatur tinggi akan tetapi tidak harus tumbuh pada

lingkungan dengan suhu tinggi (Kristianti, dkk, 2017) dan bakteri *Streptococcus thermophilus* tidak mampu tumbuh pada lingkungan dengan suhu kurang lebih 10°C dan dapat tumbuh optimum pada kondisi pH optimum yaitu 6,5 (Helfrich and Westoff, 1980).



Gambar 2. 4 *Streptococcus thermophilus*
(Tabunan, 2016)

2.4.4 *Micrococcus* sp

Micrococcus sp merupakan salah satu jenis bakteri gram positif berpotensi probiotik yang dapat ditemukan pada saluran pencernaan ikan. Bakteri ini merupakan bakteri non patogen yang menguntungkan bagi ikan karena berpotensi sebagai probiotik yang mampu mencegah masuknya penyakit pada ikan. Berdasarkan morfologinya, bakteri *Micrococcus* sp memiliki ciri morfologi seperti sel berbentuk menyerupai bola, bentuk koloni bulat dengan tepian timbul, umumnya koloni berwarna kuning, tidak bersifat motil, dan dapat tumbuh pada suhu 30-37°C.

2.5 Definisi dan Jenis Bakteri Patogen

Bakteri patogen merupakan sebutan dari jenis bakteri yang bersifat parasit yang dapat menyebabkan penyakit. Sedangkan patogenitas merupakan suatu kemampuan bakteri dalam menimbulkan suatu penyakit. Bakteri yang bersifat patogen umumnya dapat menginfeksi dan menyerang sistem kekebalan tubuh inang. dalam menginfeksi sel inang yang ditumpangi, bakteri patogen menerapkan beberapa tahapan, yang diawali dengan kolonisasi pada titik tertentu dalam sel inang, bakteri melakukan pembelahan sel, perusakan sel, memasuki aliran darah, penambatan pada organ target hingga merusak organ target. Adapun beberapa jenis bakteri patogen yang dapat memicu timbulnya penyakit sebagai berikut.

2.5.1 *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* merupakan salah satu kelompok bakteri gram negative yang masuk ke dalam famili Enterobacteriaceae dan kelas Scotobacteria (Brooks *et al*, 2001). Bakteri jenis ini pertama kali ditemukan pada tahun 1888, oleh Theodor Esherich yang berhasil mengidentifikasi bakteri jenis *Escherichia coli* pada spesimen seseorang yang mengidap gejala entiris atau inflamasi saluran usus, yang ditandai dengan diare disertai sakit perut, dan muntah. Ditinjau dari karakteristik morfologinya, bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri yang berbentuk batang hingga coccus yang memiliki ukuran sel dengan panjang 2,0 hingga 6,0 μm , tidak dapat membentuk spora, dan bersifat fakultatif anaerob (Carter and Wise, 2004).

Bakteri *Escherichia coli* dapat tumbuh optimum pada suhu 37 °C dan banyak ditemukan hidup pada usus besar hingga kotoran manusia atau hewan. Menurut Maruka, *et al* (2017) bakteri *Escherichia coli* merupakan salah satu jenis bakteri yang mudah dalam proses persebarannya, umumnya bakteri ini dapat tersebar melalui air yang tercemar, mengontaminasi bahan-bahan yang tersentuh secara langsung ataupun hidup pada saluran pencernaan hewan atau manusia. Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri yang mampu tumbuh baik pada berbagai macam lingkungan baik lingkungan dengan kadar asam yang rendah ataupun tinggi. Bakteri *Escherichia coli* yang menginfeksi inang atau telah beradaptasi pada tubuh manusia mampu menyerang sistem imunitas tubuh dan berakibat pada timbulnya suatu penyakit. Bakteri *Escherichia coli* mampu menempel pada mukosa usus dengan menggunakan pilus atau pili yang menonjol dari bagian dinding sel bakteri. Adapun gejala yang dapat timbul karena terinfeksi bakteri *Escherichia coli*, antara lain infeksi saluran pencernaan yang dapat menjadi penyebab utama diare, infeksi pada saluran kemih, serta meningitis total (Winiati, *et al*, 2018)

2.5.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri pathogen yang tergolong dalam bakteri gram positif, yang memiliki karakteristik seperti memiliki sel berbentuk bulat atau kokus, dengan diameter sel 0,5-1,0 mm. bersifat non motil, memiliki dinding sel dengan dua penyusun utama yaitu asam teikoat dan peptidoglikan, hidup secara bergerombol, dan tidak dapat membentuk spora (BSN, 2015). Bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki ciri koloni yang berwarna kuning keemasan hingga abu-abu, dengan bentuk koloni yang bulat, bertekstur halus, mengkilat dan menonjol (Jawetz 2005) Umumnya Bakteri *Staphylococcus aureus* bersifat aerob dan anaerob dan dapat tumbuh diberbagai lingkungan seperti udara, debu, makanan, peralatan makan, susu, air, bahkan hidup pada kulit tubuh manusia atau hewan, rambut dan saluran pernapasan (Chotiah, 2009). Bakteri *Staphylococcus aureus* dapat masuk kedalam tubuh manusia melalui folikel rambut, kelenjar keringat, hingga bekas luka. Kehadiran bakteri ini dapat menyebabkan berbagai infeksi dari yang bersifat kronis seperti endokarditis dan osteomielitis, infeksi serius seperti meningitis, pneumonia, mastitis hingga infeksi pada saluran urin (Yuwono, 2011).

2.6 Antibakteri

Antibakteri merupakan suatu senyawa atau komponen kimia yang memiliki kemampuan dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan Sulistyono (1971) pada umumnya antibakteri dapat digunakan dalam pengendalian infeksi atau penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme, mencegah perusakan bahan oleh mikroorganisme patogen, mencegah penyebaran mikroorganisme yang bersifat merugikan. Berdasarkan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri, senyawa antibakteri memiliki beberapa cara. Berdasarkan (Pelczar and Chan, 1998) senyawa antibakteri mampu bekerja melalui beberapa mekanisme, sebagai berikut.

1.) Merusak Dinding Sel

Mikroorganisme memiliki pelindung sel yang disebut dengan dinding sel. Dinding sel pada suatu mikroorganisme dapat difungsikan sebagai pelindung sel, mengatur zat-zat yang dari dalam sel dan berperan dalam proses pembelahan sel bakteri. Adanya kerusakan yang terjadi pada dinding sel dapat memicu kematian bagi bakteri. Dengan masuknya zat atau bahan antimikroba dapat memicu kerusakan pada dinding sel bakteri. Pada bakteri gram negatif, zat antimikroba dapat masuk melalui porin atau lapisan luar bakteri dan masuk ke dalam lapisan peptidoglikan hingga membentuk ikatan protein. Sedangkan pada bakteri gram positif zat antimikroba dapat langsung masuk pada lapisan peptidoglikan, dan membentuk ikatan protein hingga terjadi lisis pada sel bakteri.

2.) Menghambat Kerja Enzim

Suatu mikroorganisme memiliki suatu enzim yang digunakan untuk membantu proses berlangsungnya metabolisme. Masuknya zat antimikroba pada sel bakteri dapat memicu penghambatan kerja enzim sehingga dapat memicu kematian pada sel bakteri.

3.) Merubah permeabilitas dari sel membrane

Fungsi dari membrane sel ialah untuk memelihara suatu komponen-komponen penyusun sel dan secara efektif mengatur keluar masuknya zat yang ada pada sel bakteri dan komponen luar. Dengan adanya kerusakan pada membran sel dapat menyebabkan keluarnya ion organik, asam amino ataupun nukleotida dari dalam sel.

4.) Mekanisme bakterisidal yaitu mematikan bakteri melalui pembunuhan sel tanpa adanya pecah sel, melalui mekanisme bakteriostatik yaitu dengan menghambat pertumbuhan bakteri, dan melalui mekanisme bakteriolitik yaitu pengurangan jumlah sel mikroba disertai lisis atau pecah sel.

2.7 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji Aktivitas antibakteri merupakan serangkaian uji yang dilakukan dalam menentukan aktivitas ataupun kemampuan suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Dalam uji antibakteri ini dapat dilakukan secara langsung melalui metode difusi. Adapun metode difusi atau *disc diffusion test* merupakan salah satu jenis uji antibakteri yang biasa digunakan dalam melihat kemampuan daya hambat suatu senyawa antibakteri melalui diameter zona bening atau zona hambat yang terbentuk. Pada uji aktivitas antibakteri melalui metode difusi dapat dilakukan melalui beberapa cara antara lain metode lubang atau sumuran, metode silinder, dan metode kertas cakram.

Metode kertas cakram (*Kirby and Bauer*) merupakan teknik pengujian secara difusi yang dilakukan untuk melihat kepekaan suatu senyawa antibakteri. metode ini dilakukan dengan menggunakan kertas cakram atau kertas saring yang difungsikan sebagai tempat penampungan zat atau senyawa antimikroba. Paper disk tersebut nantinya diletakkan pada media agar yang telah diinokulasikan bakteri uji dan diinkubasi pada suhu 37 °C. Hasil dari pengujian menggunakan metode kertas cakram ini berupa zona bening yang terdapat pada tepian kertas cakram, adapun zona bening yang terbentuk tersebut menandakan bahwa terjadi penghambatan pertumbuhan pada mikroba uji (Pelczar and Chan, 1988).

2.8 Integrasi Keislaman Mengenai Bakteri

Islam merupakan agama *kamil* yang berarti sempurna dan dan *syamil* yang berarti menyeluruh. Agama Islam mengatur segala aspek kehidupan baik dari segi ciptaan, sains, penyakit hingga pengobatan. Allah SWT merupakan dzat yang maha pengasih dan maha penyayang, yang menciptakan bumi beserta aspek biologis di dalamnya. Di dalam surah An-Nahl ayat 13 Allah SWT berfirman:

وَمَا ذَرَأْنَا لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانَهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَذَكَّرُونَ

Artinya: *dan (Dia juga mengendalikan) apa yang Dia ciptakan untukmu di bumi ini dengan berbagai jenis dan macam warnanya. Sungguh, pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran dengan tepat. (An Nahl ayat 13)*

Dari potongan ayat diatas dapat diketahui bahwa bumi dan seluruh isinya merupakan tanda-tanda kebesaran Allah SWT. Segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah memiliki beragam bentuk dan manfaat masing-masing. Allah menciptakan berbagai macam jenis makhluk hidup dari yang berukuran besar hingga ciptaan yang bersifat renik seperti mikroorganisme. Semua makhluk yang diciptakan oleh Allah dengan berbagai macam bentuk, tidak semata-mata hanya untuk pelengkap isi bumi, akan tetapi Allah menciptakan beragam jenis ciptaan tersebut untuk memberikan berbagai manfaat bagi semua makhluk yang diciptakanNya. Dalam firman Allah SWT pada surah Al-Baqarah ayat 26 dan yang berbunyi

﴿ إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا ۗ ﴾

Artinya: *Sesungguhnya Allah tidak segan membuat perumpamaan seekor nyamuk atau yang lebih kecil dari itu. (Al Baqarah ayat 26)*

Dari potongan surah Al-Baqarah ayat 26 diatas dapat menjadikan bukti bahwa segala sesuatu yang diciptakan Allah SWT memiliki berbagai macam bentuk dan ukuran. Dalam firman Allah tersebut, Allah memberikan perumpamaan seekor nyamuk yang memiliki ukuran kecil, dan kalimat “*fama fauqoha*” yang memiliki arti lebih kecil dari itu, tentunya dari penggalan ayat tersebut dapat disimpulkan bahwa adanya makhluk hidup yang berukuran lebih kecil dari nyamuk seperti mikroorganisme benar adanya. Dan perlu diketahui bahwa segala sesuatu yang diciptakan dan ditetapkan oleh Allah memiliki berbagai macam manfaat. Dari Said, dalam Qatadah menyebutkan bahwa sesungguhnya Allah membenarkan sesuatu hal baik yang memiliki ukuran kecil hingga besar.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksploratif dan eksperimental, dimana pada metode eksploratif data diperoleh melalui kegiatan observasi secara langsung yaitu dengan melakukan pengamatan terhadap saluran pencernaan ikan lele untuk diteliti lebih lanjut terkait bakteri probiotik yang terkandung di dalamnya. Adapun bakteri probiotik, diisolasi dari saluran pencernaan ikan lele pada bagian lambung dan usus, selanjutnya dianalisis dari segi morfologi baik secara mikroskopis, makroskopis, dan karakteristik biokimia, uji probiotik yang dilakukan dengan serangkaian uji aktivitas amilolitik dan aktivitas proteolitik, untuk kemudian diuji potensinya dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Tahap pengujian kemampuan daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan sebanyak empat kali pengulangan berdasarkan rumus Fedreer (1963). Pada tahap uji daya hambat ini, digunakan 2 kontrol positif dan negatif yaitu *chloramphenicol* dan larutan fisiologis NaCl sebagai kontrol negatif. Adanya perlakuan kontrol ini digunakan sebagai pembanding terhambat atau tidaknya pertumbuhan bakteri pada tahap uji kemampuan daya hambat. Adapun rumus Feedrer yang digunakan untuk menentukan banyaknya pengulangan dan tabel perlakuan sebagai berikut.

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5(r-1) \geq 15$$

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 15+5$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq \frac{20}{5}$$

$$r \geq 4$$

Keterangan :

r : pengulangan

t : perlakuan

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi incubator, autoclave, pisau, pipet tetes, erlenmeyer, cawan petri, bunsen, beaker glass, mortal porselen, gelas ukur, LAF (*Laminar Air Flow*), timbangan digital, tabung reaksi, rak tabung, sarung tangan, gunting dan pinset, jarum ose, lemari pendingin, hot plate stirrer, object glass, cover glass, mikroskop, jangka sorong, mikropipet

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi sampel organ saluran pencernaan ikan lele (*Clarias sp*) yaitu bagian usus dan lambung, isolat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, aquades, media MRSA (*deMan Rogosa Sharpe Agar*) dan MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*), media uji probiotik meliputi media Strach agar, media SMA (*Skim Milk Agar*), uji biokimia meliputi media (*Simmon Citrate*), MIO (*Motility indol ornithin*), Media MRVP (*Methyl Red dan Voges Proskauer*), reagen Kovacs, H₂O₂, iodine 2%, reagen KOH 3%, Bahan untuk uji pewarnaan gram (Kristal violet, safranin, lugol, aquades dan alcohol), Paper disk, minyak emersi, alcohol 70%, Asam sulfat (H₂SO₄)1%, Barium Clorida (BaCl₂) 1%, NaCl fisiologis, kapas, aluminium foil, kertas label.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian pada penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas pada penelitian ini berupa jenis bakteri probiotik yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan lele (*Clarias sp*)
2. Variabel terikat pada penelitian ini adalah kemampuan bakteri probiotik dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
3. Variabel kontrol, meliputi media selektif MRS (*De Man Rogosa Sharpe*) yang digunakan untuk mengisolasi bakteri probiotik, suhu inkubasi yang sesuai yaitu 37°C.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengambilan Sampel Ikan

Sampel ikan lele (*Clarias* sp) diperoleh dari kolam budidaya ikan lele yang berlokasi di Desa Leminggir, Kecamatan Mojosari, Kabupaten Mojokerto. Ikan lele yang digunakan sebagai sampel penelitian dipilih merupakan ikan yang tergolong dewasa dan siap panen dengan kisaran umur 4-5 bulan, memiliki kisaran berat antara 200 gram, adapun ikan lele yang diperlukan dalam penelitian ini sebanyak 15 ekor. Selanjutnya Ikan lele yang telah tersedia kemudian dimasukkan di dalam kantong plastik berukuran besar untuk teliti lebih lanjut.

3.5.2 Sterilisasi Alat

Sterilisasi merupakan suatu langkah pemanasan yang dilakukan dengan tujuan untuk memusnahkan segala jenis agen kontaminan baik mikroorganisme, bakteri, jamur, spora dan sebagainya (Tille, 2017) Pada saat melakukan sterilisasi, bungkus terlebih dahulu alat menggunakan kertas ataupun plastik tahan panas untuk menghindari kerusakan pada alat. Selanjutnya sterilisasi dapat dilakukan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C, tekanan 1 atm dalam waktu 15 menit.

3.5.3 Pembuatan Media

Dalam menumbuhkan suatu mikroba diperlukan adanya media sebagai persediaan nutrisi bagi mikroba untuk tumbuh. berikut beberapa media yang dibutuhkan pada penelitian ini dan cara pembuatannya.

1. Media MRSA (*deMann Rogosa Sharpe Agar*)

Media MRSA merupakan media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai probiotik yang mengandung beef extract, pepton, yeast extract dan bahan pendukung lainnya. Langkah pertama pembuatan media MRSA dilakukan dengan menimbang 33,575 gram serbuk MRS agar dan menambahkan 500ml aquades kedalam erlenmeyer. Selanjutnya media dipanaskan diatas

hotplate sembari diaduk hingga mendidih. setelah mendidih tutup lubang tabung erlenmeyer dengan kapas ataupun kertas wrap dan dilanjutkan dengan sterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm dalam waktu 15 menit. terakhir, tuang media kedalam cawan petri yang telah steril dan tunggu hingga memadat

2. Media MRSB (*Man Ragosa Sharpe Broth*)

Pembuatan media MRSB dilakukan dengan melarutkan sebanyak 6,2 gram serbuk MRSB dan 100 ml aquades didalam beaker glass. Selanjutnya panaskan media diatas hotplate stirrer sembari diaduk hingga media homogen. setelah itu tuang media kedalam tabung reaksi dan tutup menggunakan kapas dan aluminium foil. Terakhir, sterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm dalam waktu 15 menit.

3. Media SMA (*Skim Milk Agar*)

Pembuatan media SMA dilakukan dengan melarutkan bubuk media skim milk sebanyak 5,15 gram dalam aquades 100 ml. Selanjutnya didihkan media diatas hotplate sembari diaduk hingga media homogeny, Setelah mendidih, tutup lubang erlenmeyer dengan kapas. selanjutnya, media disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Terakhir, tuang media kedalam cawan petri yang telah steril dan tunggu hingga memadat.

4. Media SA (*Starch Agar*)

Pembuatan media SA (*Starch Agar*) dilakukan dengan melarutkan *Nutrient agar* sebanyak 2 gram dan Strach sebanyak 10 gr dalam 100 ml aquades didalam erlenmyer. Selanjutnya didihkan media diatas hotplate sembari diaduk hingga media homogen, selanjutnya tutup lubang erlenmeyer dengan kapas dan media disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. terakhir, tuang media kedalam cawan petri yang telah steril dan tunggu hingga memadat.

5. Media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Pembuatan media MHA (*Muller Hinton Agar*) dilakukan dengan melarutkan serbuk media MHA sebanyak 19 gram dalam 500 ml aquades dalam tabung erlenmeyer. Selanjutnya dididihkan media diatas hotplate hingga media homogen, setelah itu, tutup lubang erlenmeyer dengan kapas. terakhir, media disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit, dengan tekanan 1 atm dan tunggu hingga media hangat. dan tuang media kedalam cawan petri yang telah steril dan tunggu hingga memadat.

6. MIO (*Motility Indol Ornithin*)

Pembuatan media MIO dilakukan dengan melarutkan media MIO sebanyak 3,12 gram dalam 100 ml aquades dan dihomogenkan diatas hotplate stirrer. selanjutnya pindahkan media dalam tabung reaksi dan tutup mulut tabung menggunakan kapas. Kemudian sterilkan media menggunakan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.

7. Media MRVP (*Methyl Red dan Voges Proskauer*)

Pembuatan media MRVP dilakukan dengan menimbang 1,7 gram MRVP dan melarutkannya dalam 100 ml aquades didalam beaker glass.. Selanjutnya media dipanaskan diatas hot plate hingga larut. Selanjutnya pindahkan media dalam tabung reaksi dan tutup tabung menggunakan kapas dan aluminium foil. Terakhir, sterilkan media menggunakan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

8. Media SCA (*Simmon Citrate Agar*)

Pembuatan media SCA dilakukan dengan melarutkan media SCA sebanyak 2,25 gram dalam 100 ml aquades lalu media SCA dihomogenkan diatas hot plate. selanjutnya media yang telah homogen dimasukkan dalam tabung reaksi dan tutup lubang tabung menggunakan kapas atau aluminium foil lalu media disterilkan menggunakan autoclave pada suhu

121 °C dalam waktu 15 menit dengan tekanan 1 atm. Terakhir miringkan 45° media yang ada pada tabung dan padatkan.

9. Media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Pembuatan media TSIA dilakukan dengan melarutkan media TSIA sebanyak 6,45 gram dalam 100 ml aquades lalu media TSIA dihomogenkan diatas hot plate. Selanjutnya media yang telah homogen dimasukkan dalam tabung reaksi dan tutup lubang tabung menggunakan kapas atau aluminium foil lalu media disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121 °C dalam waktu 15 menit dengan tekanan 1 atm. Terakhir miringkan 45° media yang ada pada tabung dan padatkan.

3.5.4 Pembuatan Larutan Garam Fisiologis (NaCl 0,85%)

Larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%) merupakan larutan fisiologis yang digunakan dalam proses pengenceran dan larutan kontrol negatif. Pembuatan larutan fisiologis NaCl dilakukan dengan melarutkan 8,5 gram NaCl dalam 1000 ml aquades steril.

3.5.5 Persiapan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah organ pencernaan ikan lele pada bagian lambung dan usus. Ikan yang telah disiapkan dibedah dan diambil bagian organ usus dan lambungnya, lalu dimasukkan dalam larutan fisiologis NaCl 0,85%. Selanjutnya haluskan organ lambung dan usus ikan menggunakan mortal porselen.

3.5.6 Isolasi Bakteri Probiotik

Proses isolasi bakteri diawali dengan tahap pengenceran yang dilakukan pada sampel yang telah dihaluskan. Pengenceran dilakukan dengan larutan fisiologis NaCl steril dan dilakukan secara berseri dari pengenceran 10^{-1} , hingga pengenceran 10^{-5} dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya pipet sampel dari pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} sebanyak 0,1 ml dan inokulasikan pada cawan petri yang berisi

media MRSA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah melewati masa inkubasi selama 24 jam, akan tampak berbagai macam jenis koloni bakteri dengan karakteristik morfologi yang berbeda dari segi warna, tepian, dan bentuk koloni. Dari berbagai macam koloni bakteri yang tumbuh pada media, selanjutnya diambil satu jenis koloni bakteri yang paling dominan dari segi bentuk, tepian dan warna pada masing-masing media hasil pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} dari lambung dan usus yang ditumbuhi bakteri.

Selanjutnya, isolasi masing-masing koloni bakteri probiotik dengan mengambil sebanyak satu ose bakteri dan inokulasikan pada media MRSA baru dengan metode cawan gores. Tahap isolasi ini dilakukan secara bertahap hingga didapatkan biakan murni bakteri atau koloni bakteri tunggal. selanjutnya kultur bakteri pada diinkubasi selama 24 jam hingga 48 jam pada suhu 37°C. Koloni bakteri yang diambil adalah koloni bakteri yang paling dominan yang letaknya jauh dengan koloni bakteri lainnya. Selanjutnya dilanjutkan dengan pemurnian bakteri yang dilakukan dengan metode streak plate hingga di dapatkan isolat bakteri murni. Adapun tahap pemurnian dilakukan minimal tiga kali pengulangan (Feliatra, 2004).

3.5.7 Identifikasi Bakteri

1. Pengamatan Makroskopis Koloni Bakteri

Pengamatan makroskopis dilakukan pada isolat murni hasil dari isolasi bakteri. Adapun karakteristik makroskopis yang diamati seperti bentuk koloni bakteri yang terdiri dari berbagai macam model seperti bulat (circular), menyerupai benang (filamentus), menyerupai akar (rhizoid) ataupun bentuk tidak teratur. Selanjutnya pengamatan makroskopis juga dilakukan pada warna koloni. pada umumnya warna koloni ini terdiri dari berbagai macam jenis seperti crem, keputihan, kuning, kemerahan, ungu, hijau, jingga, pink dan coklat. yang terdiri dari berbagai macam. Selanjutnya dilakukan pengamatan makroskopis terhadap elevasi dan margin koloni. Pengamatan bentuk elevasi dilakukan dengan mengamati bentuk koloni apabila dilihat dari samping, adapun beberapa macam elevasi

koloni bakteri seperti cembung melengkung (convex), timbul datar (raised) ataupun elevasi rata (flat). Sedangkan pengamatan margin dilakukan dengan melihat sisi dari atas koloni, margin koloni bakteri dapat berbentuk ombak (lobate), benang, utuh (entire), bergigi, ataupun keriting.

2. Pengamatan Mikroskopis Bakteri

Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan metode pewarnaan pada bakteri, hal ini dilakukan guna untuk melihat karakteristik dari bakteri yang meliputi bentuk secara mikroskopis dan jenis gram bakteri. Langkah pertama pewarnaan bakteri diawali dengan pembuatan apusan bakteri pada objek glass dengan jarum ose. adapun bakteri yang akan diamati diperoleh dari isolat murni yang telah diinkubasi selama 48 jam. setelah apusan pada object glass telah dibuat, dilanjutkan dengan fiksasi diatas api bunsen. Setelah itu tetesi apusan sampel dengan kristal violet dan diamkan hingga 1 menit, dan cuci zat warna dengan aquades yang mengalir. selanjutnya tetesi apusan dengan lugol, diamkan selama 1 menit, dan semprot dengan alkohol 70%. Selanjutnya, tetesi apusan menggunakan safranin kemudian diamkan selama satu menit, lalu cuci menggunakan aquades mengalir. Terakhir, keringkan menggunakan kertas serap atau tissue, tutup dengan cover glass, dan amati karakteristik gram dan bentuk bakteri dibawah mikroskop perbesaran 1000x.

3. Uji Biokimia

Identifikasi bakteri juga dilakukan secara biokimia, tujuan dari uji biokimia dilakukan untuk menentukan suatu jenis isolat bakteri berdasarkan sifat fisiologi (Cowan, 1993) dan digunakan untuk meminimalisir kesalahan dalam proses identifikasi (Mac Faddin, 1980) adapun serangkaian dari uji biokimia yang dilakukan dalam penelitian ini sebagai berikut.

a. Uji TSIA

Langkah pertama, ambil satu ose isolat bakteri murni dan inokulasikan pada media TSIA miring dengan cara tusuk pada bagian butt (bagian yang tegak) dan zig zag pada bagian slant (bagian yang miring), Kemudian inkubasi pada suhu 29 °C selama 24 jam, lalu amati perubahan warna yang terjadi. jika pada bagian tegak berwarna kuning dan bagian slant (miring) berwarna merah menandakan bahwa bakteri mampu memfermentasi glukosa, jika bagian slant dan butt sama-sama berwarna kuning, menandakan bahwa bakteri mampu memfermentasi glukosa laktosa ataupun sukrosa, apabila pada bagian slant dan butt berwarna merah menandakan tidak adanya proses fermentasi, jika terdapat endapan hitam menandakan bahwa bakteri mampu memproduksi H₂S, jika terdapat gelembung udara menandakan bahwa bakteri mampu memproduksi gas (Yusuf, 2009).

b. Uji Citrat

Langkah pertama, ambil satu ose isolat bakteri murni dan inokulasikan pada media Simmon citrat secara zig zag. Kemudian inkubasi pada suhu 29 °C selama 24 jam. Uji citrat ini dapat dikatakan positif apabila terdapat perubahan warna pada media yaitu media yang semula berwarna hijau berubah menjadi biru. sedangkan hasil uji dikatakan negatif apabila tidak terjadi perubahan warna pada media (Irianto, 2006).

c. Uji Motilitas

Langkah pertama, ambil satu ose isolat bakteri murni dan inokulasikan pada media MIO, Kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji motilitas dikatakan positif apabila terdapat sebaran pertumbuhan bakteri disekitar tusukan, dan hasil negatif apabila tidak terdapat rambatan disekitar tusukan.

d. Uji MRVP (*Methyl Red Voges Proskauer*)

Langkah pertama, ambil satu ose isolat bakteri murni dan inokulasikan pada media MRVP cair, Kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. kemudian bagi media yang telah diinkubasi menjadi dua tabung. tabung pertama digunakan untuk uji MR dan tabung kedua digunakan untuk uji VP. untuk uji MR ditambahkan 3 hingga 4 tetes *Methyl Red*. Sedangkan untuk uji VP, tambahkan 3 tetes KOH 40% dan 6 tetes *α -naphthol*. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna larutan dari warna kuning menjadi warna merah, dan reaksi negatif ditandai dengan warna kuning hingga kecoklatan (Sari dan Apridamayanti, 2014).

e. Uji Katalase

Langkah pertama, tetesi object glass dengan reagen H₂O₂ 3%, kemudian ambil satu ose bakteri dari stok kultur murni dan celupkan pada reagen H₂O₂ diatas object glass. pada uji ini hasil dapat dikatakan positif apabila terdapat gelembung gas, dan hasil negatif apabila tidak terdapat gelembung gas (Sari dan Apridamayanti, 2014).

3.5.8 Uji Probiotik Bakteri

Seleksi bakteri probiotik dilakukan melalui uji kemampuan bakteri dalam mendegradasi karbohidrat dan protein. Prinsip dasar dari bakteri probiotik yang berasal dari saluran pencernaan dalam memperlancar penyerapan adalah dengan memanfaatkan kemampuan suatu mikroorganisme dalam menguraikan molekul kompleks seperti karbohidrat, lemak, ataupun protein menjadi molekul yang lebih sederhana melalui enzim yang dimiliki oleh suatu mikroba (Effendi, 2002). Adapun uji yang digunakan untuk mengetahui aktivitas dari enzim yang terdapat pada bakteri probiotik dilakukan dengan serangkaian uji sebagai berikut.

1. Uji Aktivitas Amilolitik

Inokulasikan satu ose bakteri hasil biakan murni dan goreskan pada cawan petri yang berisi media Strach Agar. selanjutnya inkubasi selama 24 jam pada suhu 35-37 °C. Setelah masa inkubasi selesai, dilanjutkan dengan uji amilum dengan meneteskan iodine disekitar permukaan agar yang ditumbuhi bakteri. Uji hidrolisis pati (Amilum) dapat dikatakan positif apabila terdapat zona berwarna kuning bening yang berarti bakteri mampu menghasilkan enzim amilase, dan mampu menghidrolisis amilum (Cappucino, 1983).

2. Uji Aktivitas Proteolitik

Inokulasikan satu ose bakteri hasil biakan murni dan goreskan pada cawan petri yang berisi media skim milk agar (SMA). selanjutnya inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Uji hidrolisis protein dikatakan positif apabila terdapat zona bening disekitar koloni. Berdasarkan (Ferdiaz, 1992) jika dari hasil uji menunjukkan hasil positif, maka dapat diartikan bahwa bakteri memiliki aktivitas proteolitik.

3.5.9 Uji Daya Hambat Bakteri Probiotik Terhadap Bakteri Patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Uji Daya hambat dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui efektivitas isolat bakteri probiotik yang diisolasi dalam menghambat bakteri patogen. Uji daya hambat dilakukan dengan beberapa langkah. Langkah pertama, dilakukan Inokulasi pada kultur murni bakteri probiotik. Inokulasi dilakukan dengan mengambil satu ose bakteri probiotik murni dari masing-masing media padat MRSA dengan empat kali pengulangan dari setiap sampel bakteri probiotik, kemudian bakteri dikultur dalam media MRSB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya dilakukan peremajaan bakteri uji *E.Coli* dan *S. Aureus*, peremajaan dilakukan dengan cara mengambil 1 ose bakteri uji dari stok kultur murni, kemudian ditumbuhkan pada media baru, setelah masing-

masing bakteri uji diinokulasikan pada media baru dilanjutkan dengan proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya dilakukan Pembuatan larutan standar MC Farland 0,5 dibuat dengan mencampurkan 9,95 ml Asam sulfat (H₂SO₄)1% dan 0,05 ml Barium Clorida (BaCl₂) 1% (Whitman and Mac Nair, 2010).

Langkah selanjutnya dilakukan dengan pembuatan Isolat bakteri uji dan penyetaraan dengan larutan standar. Bakteri yang telah ditumbuhkan pada media baru, selanjutnya di inokulasikan kedalam 10 ml larutan fisiologis NaCl, dan dilakukan pengenceran bertingkat dari 10⁻¹ hingga 10⁻⁶. Dari masing-masing hasil pengenceran tersebut, dilakukan penyetaraan kekeruhan dengan larutan MC Farland 0,5. Setelah diperoleh isolat yang tingkat kekeruhannya sebanding dengan larutan standar, selanjutnya isolat bakteri uji dibiakkan pada media uji MHA (*Muller Hinton Agar*) dengan metode spread plate pada cawan petri sebanyak 50 µL dan diratakan dengan cara menggoyang cawan petri membentuk angka 8. Pada perlakuan kontrol positif dilakukan dengan menggunakan antibiotik jenis *chlorompenicol* dengan konsentrasi 5%. Pembuatan larutan kontrol positif *chlorompenicol* dilakukan dengan menambahkan 0,5 gram *chlorompenicol* dan sebanyak 5 ml aquades steril hingga diperoleh konsentrasi 5%.

Selanjutnya, siapkan beberapa kertas cakram berdiameter 1 cm dan celupkan kedalam masing-masing suspensi bakteri probiotik pada media MRSB. Untuk perlakuan kontrol, celupkan kertas cakram dalam larutan NaCl fisiologis sebagai kontrol negatif, dan celupkan kertas cakram dalam *chloramphenicol* sebagai kontrol positif. Setelah itu letakkan kertas cakram yang telah dicelup kedalam masing-masing media MHA yang berisi bakteri uji. dan inkubasi pada suhu 37 °C dalam waktu 24 jam dengan posisi cawan terbalik. Setelah diinkubasi, amati zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram dan ukur diameter zona hambat tersebut.

Terbentuknya zona hambat ditandai dengan adanya zona bening disekitar kertas cakram yang menandakan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen yang diujikan. Selanjutnya, pengukuran diameter zona

hambat dilakukan dengan mengukur luas zona hambat yang terbentuk secara keseluruhan disekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong. Penentuan luas zona hambat dilakukan dengan menghitung luas zona bening yang terbentuk secara keseluruhan dikurangi dengan diameter kertas cakram (6 mm).

3.6 Analisis Data

Data yang telah diperoleh dari hasil identifikasi bakteri secara biokimia, selanjutnya disesuaikan dengan buku kunci identifikasi yang berjudul "*Manual for Identification of Medical Bacteria*" (Cowan and Steels, 1993). Sedangkan perhitungan daya hambat mengacu pada standar *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. Adapun data-data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis secara deskriptif yaitu dengan mendeskripsikan secara sistematis akurat secara ilmiah dan analisis secara statistik.

Adapun analisis statistik, dilakukan dengan menggunakan uji one way anova. Analisis varian satu jalur atau one way anova dilakukan untuk melihat perbedaan pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diamati. Untuk dapat melakukan uji anova, terdapat beberapa asumsi yang harus terpenuhi yaitu data berdistribusi normal dan homogen, untuk itu diperlukan uji normalitas dan homogenitas sebelum melakukan uji one way anova. Setelah dilakukan uji anova dan terdapat perbedaan pengaruh perlakuan maka dapat dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) untuk melihat perbedaan perlakuan apabila dari hasil hipotesis nol tidak diterima (Montgomery, 2011). Untuk data yang tidak memenuhi syarat uji anova, seperti tidak berdistribusi normal atau homogen, dapat dilanjutkan dengan uji Kruskal-Wallis. Uji Kruskal-Wallis merupakan uji non parametric yang digunakan untuk menguji ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antar kelompok independen atau dependen (Ostertagova *et al.*, 2014) Selanjutnya dilakukan uji Mann-Whitney untuk melihat perbedaan antar perlakuan apabila terdapat perbedaan signifikan pada uji Kruskal-Wallis.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri probiotik dilakukan dengan menggunakan media MRSA. Berdasarkan Rahayu dan Margino (1997) media MRSA merupakan media selektif yang disarankan untuk menumbuhkan bakteri berpotensi probiotik atau asam laktat. Isolasi bakteri dilakukan dengan mengambil sebanyak 0,1 ml isolat bakteri yang telah diinkubasi dari seri pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-5} dari masing-masing sampel saluran pencernaan yaitu organ usus dan lambung untuk kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Berdasarkan Arfiandi (2016) menyatakan bahwa bakteri probiotik dapat tumbuh secara optimal pada suhu 37°C hingga 41°C . Penentuan suhu dengan tepat dapat mempengaruhi proses pertumbuhan mikroorganisme, menurut Garbutt (1997) penggunaan suhu rendah pada proses penyimpanan bakteri dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri sekaligus dapat memperpanjang fase kehidupan bakteri dalam beradaptasi, sedangkan penggunaan suhu diatas maksimum dapat menyebabkan kematian pada sel-sel mikroorganisme (Ray, 2001).

Setelah melewati masa inkubasi selama 24 jam, terdapat koloni bakteri yang tumbuh pada media MRSA dari hasil pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} sedangkan pada pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} tidak ditemukan adanya pertumbuhan mikroorganisme. Seperti pada tabel 4.1 dibawah ini.

Tabel 4.1 Tingkat pengenceran yang ditumbuhi bakteri

No	Pengenceran	Organ Pencernaan	Kode
1.	10^{-2}	Usus	I1A
2.	10^{-3}	Usus	I2A
3.	10^{-2}	Lambung	I1B
4.	10^{-3}	Lambung	I2B

Sumber: Data pribadi, 2022

Pada pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} , yang ditumbuhi beberapa koloni bakteri selanjutnya dilakukan isolasi dengan memilih bakteri yang paling dominan yang letaknya jauh dengan koloni bakteri lainnya dan memiliki perbedaan karakteristik warna, tepian. Dari hasil isolasi diperoleh 4 jenis isolate yang diberi kode I1A dan I2A untuk isolat yang diperoleh dari sampel usus dan isolat I1B dan I2B untuk isolat yang diperoleh dari lambung. Sedangkan pada media yang tidak ditumbuhi koloni bakteri, tidak dilanjutkan dengan proses isolasi hingga pemurnian. Berdasarkan Wasteson dan Hornes (2009) pada Yunita *et al* (2015) ketidak tumbuhan mikroorganisme pada media dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya jumlah mikroorganisme yang berkurang pada saat pengenceran, tujuan dari adanya pengenceran bertingkat yaitu untuk mengurangi jumlah mikroba yang terdapat pada suatu cairan, sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi tingkat pengenceran, maka jumlah mikroba yang dihasilkan akan sedikit. Selanjutnya, isolat yang telah diberi kode, dimurnikan sebanyak tiga kali untuk memperoleh isolat yang benar-benar murni. Setelah didapatkan isolat murni, selanjutnya dilakukan identifikasi untuk menentukan jenis bakteri probiotik.

4.2 Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan setelah didapatkan kultur murni dari hasil isolasi bakteri pada sampel saluran pencernaan ikan lele pada bagian organ usus dan lambung. Adapun tujuan dari identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui jenis bakteri probiotik yang terdapat pada sampel usus dan lambung ikan lele (*Clarias* sp). Dalam identifikasi ini dilakukan pengamatan secara makroskopis, mikroskopis, dan melalui karakteristik uji biokimia.

4.2.1 Morfologi Secara Makroskopis

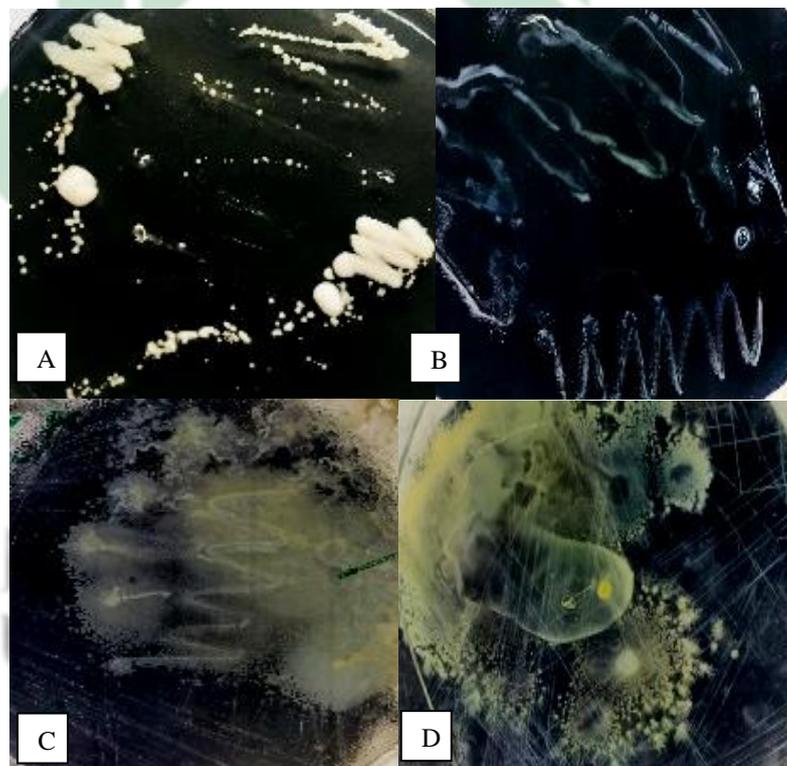
Pengamatan makroskopis bakteri dilakukan berdasarkan ciri-ciri morfologi yang tampak dan dapat dilihat dari bentuk dan warna koloni, elevasi atau permukaan atas, dan tepian atau margin. adapun dari hasil

pengamatan makroskopis dapat dilihat melalui tabel 4.2 dan gambar 4.1 dibawah ini.

Tabel 4.2 Morfologi Koloni Bakteri secara Makroskopis

Kode Isolat	Organ asal	Koloni			
		Bentuk	Warna	Tepian	Elevasi
I1A	Usus	Bulat	Putih	Entire	Convex
I2A	Usus	Bulat	Putih	Entire	Flat
I1B	Lambung	Bulat	Kuning	Entire	Flat
I2B	Lambung	Bulat	Kuning	Entire	Convex

Sumber: Data pribadi, 2022



Gambar 4.1 Morfologi bakteri secara makroskopis. Keterangan A= Bakteri dengan kode isolat I1A, B= Bakteri dengan kode isolat I2A, C= Bakteri dengan kode isolat I1B, D= Bakteri dengan kode isolat I2B. (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2022)

Dari tabel 4.2 dan gambar 4.1 diatas, menunjukkan bahwa dari total 4 isolat bakteri memiliki ciri morfologi yang hampir sama dari segi bentuk dan tepian. Morfologi bakteri dengan kode isolate I1A yang

diisolasi dari organ usus memiliki koloni yang berbentuk bulat dengan warna koloni putih, memiliki tepian koloni entire dan elevasi convex atau cembung. Sedangkan pada isolat dengan kode I2A yang diisolasi dari organ usus menunjukkan ciri morfologi seperti koloni yang berbentuk bulat berukuran kecil, koloni bakteri berwarna putih memiliki tepian entire atau bulat rata dan elevasi datar. Isolat dengan kode I1B yang diisolasi dari organ lambung menunjukkan ciri koloni berbentuk bulatan kecil, berwarna kuning, dengan tepian entire dan permukaan atas datar. Terakhir, isolat dengan kode I2B yang diisolasi dari organ lambung memiliki morfologi koloni berbentuk bulat, koloni berwarna kuning, dengan bentuk tepian bulat tidak rata dan permukaan atas convex. Berdasarkan buku *Manual for Identification of Medical Bacteria*” (Cowan and Steels, 1993) memaparkan bahwa terdapat koloni bakteri yang memiliki bentuk bulat dengan warna putih hingga cream seperti bakteri *Lactobacillus* sp, juga bakteri yang memiliki pigmen berwarna kekuningan pada koloninya seperti *Micrococcus*.

4.2.2 Morfologi Secara Mikroskopis

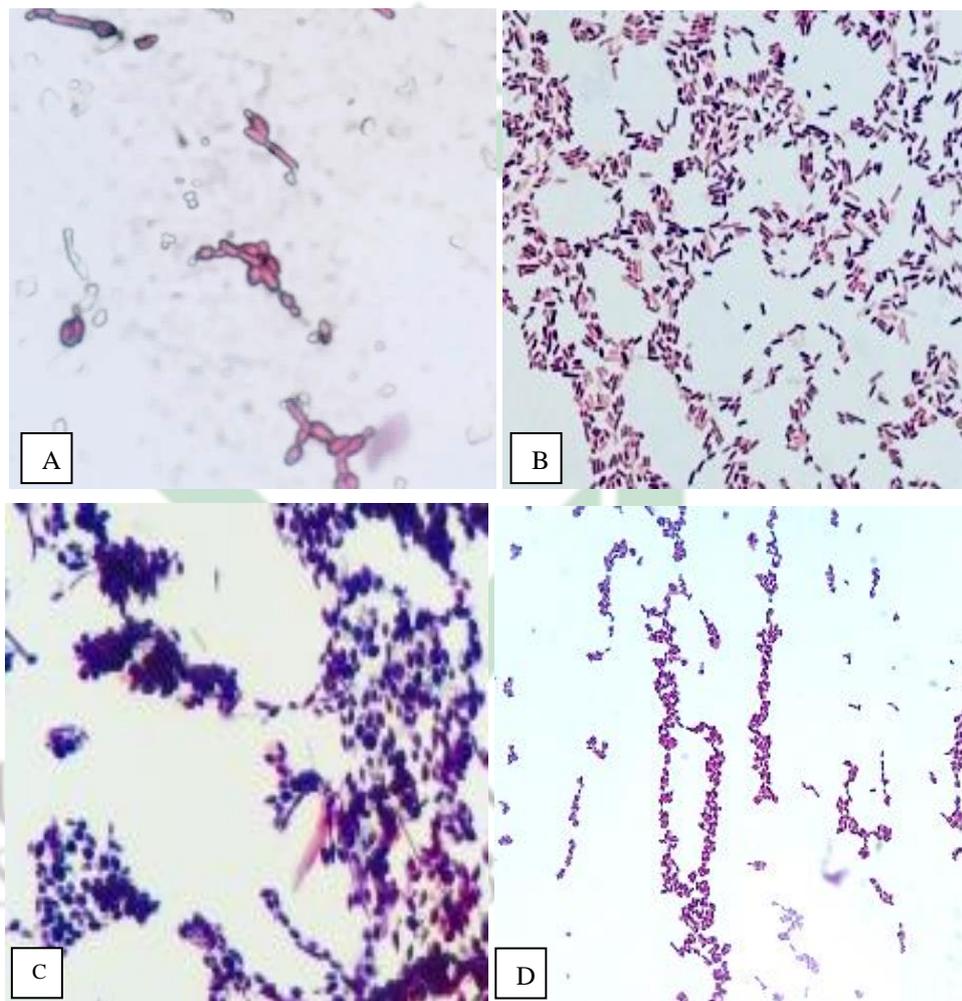
Pengamatan mikroskopis bakteri merupakan pengamatan yang dilakukan dibawah alat mikroskop. Dalam pengamatan mikroskopis ini dilakukan dengan mikroskop binokuler dengan lensa objektif 100x dan lensa okuler 10x. Adapun dalam pengamatan mikroskopis ini dilakukan untuk melihat ciri-ciri morfologi sel bakteri dari segi bentuk secara mikroskopis dan jenis gram bakteri melalui proses pewarnaan. Adapun dari hasil pengamatan morfologi secara mikroskopis bakteri dapat dilihat dari tabel 4.3 dibawah ini.

Tabel 4.3 Hasil Pengamatan Morfologi Bakteri secara Mikroskopis

Kode Isolat	Bentuk	Gram
I1A	Basil	Positif
I2A	Basil	Positif
I1B	Coccus	Positif
I2B	Basil	Positif

Sumber: Data pribadi, 2022

Dari tabel 4.3 menunjukkan bahwa dari keempat isolat bakteri merupakan bakteri golongan gram positif dan dari hasil pengamatan secara mikroskopis dapat diketahui bahwa bakteri dengan kode isolat I1A, I2A dan I2B memiliki morfologi sel berbentuk *basil* atau batang dan bakteri dengan kode isolat I1B merupakan bakteri dengan ciri morfologi berbentuk bulat atau coccus. Adapun bentuk morfologi bakteri secara mikroskopis dapat dilihat pada gambar 4.2



Gambar 4.2 Morfologi bakteri secara mikroskopis pada perbesaran 1000x. Keterangan A = Bakteri dengan kode isolat I1A, B= Bakteri dengan kode isolat I2A, C= Bakteri dengan kode isolat I1B, D= Bakteri dengan kode isolat I2B. (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2022)

Berdasarkan hasil dari pewarnaan gram, dapat diketahui bahwa keempat isolat bakteri tersebut merupakan jenis bakteri gram positif. Hal tersebut ditandai dengan sel bakteri yang berwarna ungu yang berarti

bakteri mampu mengikat zat warna dari kristal violet. Berdasarkan Madigan (2011) terlihatnya warna ungu disebabkan oleh dinding sel bakteri yang mengikat gram A (pewarna kristal violet) dan zat warna tersebut diperkuat lagi dengan pemberian gram B (lugol) sehingga pada saat dilakukan pencucian dengan alkohol (gram C) pewarna kristal violet akan tetap menempel dan tidak terpengaruh saat diberi zat pewarna gram D atau safranin yang berwarna merah. Sedangkan pada jenis bakteri gram negatif, akan terlihat berwarna merah, hal tersebut dikarenakan saat sel bakteri diberi larutan pencuci alkohol dapat berpengaruh terhadap melarutnya lipid pada membran bagian luar karena adanya peningkatan porositas dari dinding sel bakteri, sehingga zat pewarna kristal violet dan lugol akan terdegradasi dan bakteri menjadi tidak berwarna. Selanjutnya sel bakteri akan kembali terwarnai merah setelah diberikan zat pewarna safranin.

Menurut (Syulasm, 2005) Bakteri golongan gram positif tersusun dari sel yang mengandung 90% peptidoglikan dengan kandungan lipid yang rendah. Sedangkan bakteri golongan gram negatif hanya mengandung sekitar 5-20% peptidoglikan. Sel bakteri yang memiliki kandungan lemak rendah dan peptidoglikan yang tinggi dapat mengakibatkan mudahnya dinding sel bakteri terdehidrasi pada saat penambahan alkohol, hal tersebut dapat berakibat pada mengecilnya ukuran pori-pori sel dan berkurangnya daya permeabilitas sehingga zat warna dari kristal violet tidak dapat terdegradasi dan sel akan tetap berwarna ungu (Harlina, 2014). Selain itu bakteri golongan gram negatif memiliki dinding sel yang berukuran lebih tipis dibandingkan dinding sel pada bakteri gram positif (Pelczar and chan, 1986). Bakteri gram positif tersusun dari unsur khusus *teichoic* yang berfungsi untuk menjaga integritas dari dinding sel, menjaga permeabilitas eksternal, resisten terhadap autolisis dan dapat menjaga transportasi ion, dengan adanya kemampuan tersebut dapat dijadikan sebagai dasar dari dipilihnya bakteri gram positif sebagai bakteri probiotik (Brooks, *et al*, 2005).

Dari hasil pewarnaan tersebut juga dilakukan pengamatan bentuk mikroorganisme secara mikroskopis. Berdasarkan Surono (2004) umumnya bakteri yang berpotensi probiotik seperti bakteri asam laktat memiliki morfologi bentuk batang (*basil*) dan berbentuk bulat (*coccus*) hal tersebut sesuai dengan hasil pengamatan mikroskopis. pada gambar 4.1 dapat diketahui bahwa bakteri dengan kode isolat I1A, I2A dan I2B merupakan bakteri yang berbentuk basil atau batang, sedangkan bakteri dengan kode isolat I1B merupakan bakteri yang berbentuk coccus atau bulat. Berdasarkan buku identifikasi yang berjudul *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* memaparkan bahwa bakteri dari genus *Lactobacillus* merupakan bakteri yang tergolong dalam bakteri gram positif, berbentuk basil atau batang, memiliki bentuk koloni berbentuk bulat dengan tepian entire dan tidak berpigmen (Holt, *et al.*, 1994). Setelah dilakukan identifikasi secara makroskopis dan mikroskopis selanjutnya identifikasi dilakukan uji lanjutan secara biokimia.

4.2.3 Karakteristik Biokimia

Identifikasi bakteri dilakukan secara makroskopis, mikroskopis dan diuji lanjutan secara biokimia. Uji biokimia merupakan suatu cara identifikasi bakteri yang dilakukan berdasarkan pengamatan sifat fisiologis bakteri. Menurut Cowan (1993) sifat fisiologis dari berbagai jenis bakteri dapat dilihat dari adanya interaksi metabolit pada saat melakukan uji biokimia dan penambahan reagen kimia. Dari hasil uji biokimia tersebut dapat diperoleh hasil yang berbeda pada setiap isolat, perbedaan hasil tersebut menandakan bahwa terdapat perbedaan dari sifat fisiologis bakteri yang terjadi karena adanya enzim dari isolat bakteri yang berpengaruh dalam pemanfaatan reagen pada proses biokimia. Adapun hasil dari uji biokimia seperti pada Tabel 4.4 dan uraian berikut.

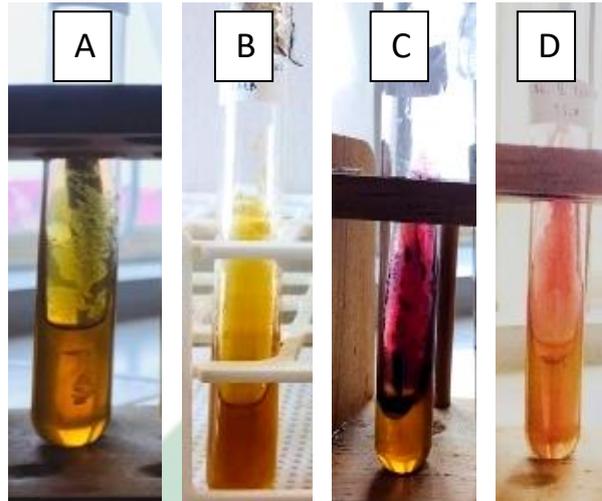
Tabel 4.4 Hasil Uji Biokimia

Uji Biokimia	Kode Isolat			
	I1A	I2A	I1B	I2B
Triple Sugar Iron Agar (TSIA)	A/A	A/A	K/A (H ₂ S)	K/A
Simmon citrate	-	-	-	+
Methyl Red (MR)	+	+	-	-
Voges Proskauer (VP)	-	-	-	+
Katalase	-	-	+	+
Motilitas	NM	NM	NM	M
Amilolitik	+	+	+	+
Proteolitik	+	+	+	+

Keterangan: A/A= Acid/acid, K/A=Alkali/Acid, NM= Non Motil, M= Motil, (+)= Reaksi Positif, (-)= Reaksi Negatif (Sumber: Data Pribadi, 2022)

A. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Uji TSIA dilakukan dengan media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*). Media TSIA merupakan media biokimia yang didalamnya terkandung tiga jenis gula seperti sukrosa, glukosa, laktosa, juga mengandung *phenol red* sebagai indikator. Berdasarkan Sari (2014) uji TSIA digunakan untuk menguji kemampuan bakteri dalam memfermentasi laktosa, sukrosa ataupun glukosa yang terkandung dalam media ataupun digunakan untuk melihat kemampuan bakteri dalam memproduksi H₂S ataupun gas. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) ini memiliki beberapa interpretasi hasil antara lain, K/A atau alkali/acid apabila pada bagian *butt* atau dasar berpigmen kuning dan pada bagian *slant* lereng berwarna merah, A/A atau acid/acid apabila pada bagian *butt* dan *slant* berwarna kuning (bersifat asam), K/K apabila pada bagian *butt* dan *slant* berwarna merah (bersifat basa), sedangkan positif H₂S ditandai dengan adanya endapan hitam (Sari, 2014). Adapun hasil uji TSIA seperti Gambar 4.3 dan tabel4.5 berikut.



Gambar 4.3 Hasil uji biokimia TSIA. Keterangan A = isolat I1A (A/A) B= isolat I2A (A/A) C= isolat I1B (K/A, H₂S) D: isolat I2B (K/A).

(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2022)

Tabel 4.5 Hasil uji TSIA (*Triple sugar Iron Agar*)

Isolat	Hasil Uji	H ₂ S
I1A	A/A (acid/aid)	Negatif
I2A	A/A (acis/acid)	Negatif
I1B	K/A (alkali/acis)	Positif
I2B	Positif	Negatif

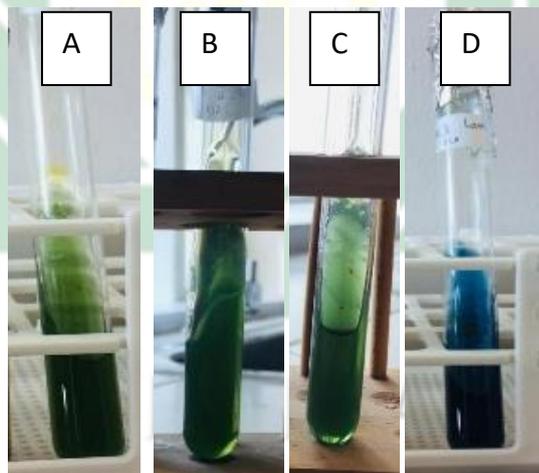
Sumber Data pribadi, 2022

Hasil dari uji TSIA menunjukkan bahwa isolat I1A dan I2A memperlihatkan hasil uji TSIA yang sama yaitu A/A (-) H₂S yang ditandai dengan adanya perubahan warna pada slant dan butt media menjadi kuning dan tidak terdapat endapan hitam. Dari hasil uji tersebut berarti bahwa bakteri mampu memfermentasi glukosa, laktosa dan sukrosa, dan tidak memproduksi H₂S. Perubahan warna pada media yang semula berwarna merah menjadi kuning dikarenakan adanya perubahan kondisi pH menjadi asam (Benson, 2001). Indikator dari media TSIA adalah *phenol red*, apabila bakteri mampu menurunkan kadar pH dari kondisi basa menjadi asam maka akan terjadi perubahan warna media TSIA yang semula berwarna merah menjadi kuning/orange (Benson, 2001). Pada isolat dengan kode I1B memperlihatkan hasil K/A (+) H₂S, dan pada kode isolat

I2B diperoleh hasil K/A (-) H₂S. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa bakteri dengan kode isolat I2A dan I2B mampu memfermentasikan glukosa. Sedangkan hasil positif H₂S terjadi pada isolat I1B yang ditandai dengan adanya endapan hitam yang berarti bakteri membentuk H₂S (Cowan, 1993).

B. Uji Citrat

Uji Citrat dilakukan dengan media Simmon citrat. Media simmon citrat memiliki kandungan *sodium sitrat*, *bromtymol blue* sebagai indikator pH dan ammonium salt sebagai sumber karbon utama. Uji citrat digunakan untuk melihat kemampuan bakteri yang diisolasi dalam memanfaatkan kandungan natrium sitrat sebagai sumber metabolisme bagi pertumbuhannya. Adapun hasil dari uji citrat seperti gambar 4.4 dan tabel 4.6 dibawah ini.



Gambar 4.4 Hasil uji biokimia simmon citrat. Keterangan A: isolat I1A, B: isolat I2A, C: isolat I1B, D: isolat I2B. (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2022)

Tabel 4.6 Hasil Uji Simmon Citrat

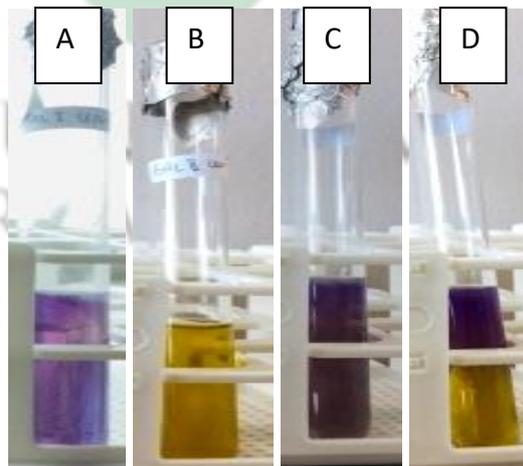
Isolat	Hasil Uji
I1A	Negatif
I2A	Negatif
I1B	Negatif
I2B	Positif

Sumber Data pribadi, 2022

Hasil dari uji citrat diperoleh hasil negatif pada isolat dengan kode A, B, C hal ini ditandai dengan tidak ditemukan adanya perubahan warna pada media, hal tersebut menandakan bahwa bakteri tidak memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon dalam proses metabolisme (Ratna, 2012). Sedangkan pada isolat I2B (kode D) diperoleh hasil positif yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna media menjadi warna biru yang berarti bakteri memanfaatkan kandungan sitrat sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan hidupnya (Ratna, 2012). Sedangkan perubahan warna yang terjadi menandakan bahwa media yang semula bersifat asam (hijau) berubah menjadi media yang bersifat basa (berwarna biru).

C. Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan media MIO (*Motility indole ornithin*), uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan pergerakan atau motilitas suatu bakteri. Bakteri yang memiliki kemampuan bergerak atau positif motil ditandai dengan timbulnya daerah rambatan atau kekeruhan disekitar tusukan media, sedangkan bakteri yang tidak memiliki kemampuan bergerak hanya tumbuh pada daerah bekas tusukan. Adapun hasil dari uji motilitas seperti gambar 4.5 dan tabel 4.7 dibawah ini.



Gambar 4.5 Hasil uji motilitas. Keterangan A: isolat I1A non motil, B: isolat I2A non motil, C: isolat I1B non motil, D: isolat I2B motil. (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2022)

Tabel 4.7 Hasil Uji Motilitas

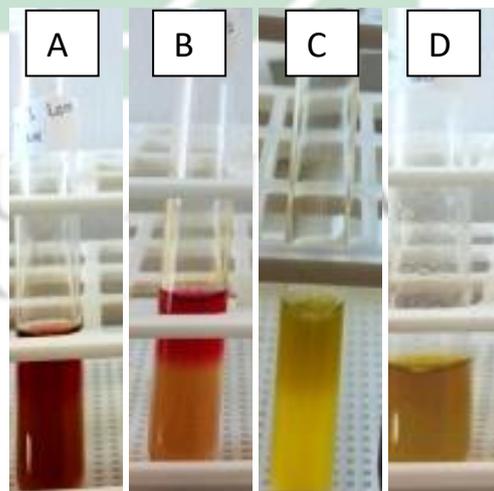
Isolat	Hasil Uji
I1A	Non Motil
I2A	Non Motil
I1B	Non Motil
I2B	Motil

Sumber Data pribadi, 2022

Dari hasil uji motilitas dapat dilihat bahwa bakteri isolat I1A, I1B, dan I2A tidak ditemukan adanya kekeruhan atau rambatan disekitar tusukan hal ini menandakan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri non motil, sedangkan pada bakteri dengan kode isolat I2B terdapat daerah rambatan disekitar tusukan yang berarti bakteri tersebut bersifat motil atau berflagel (Hafsan, 2014).

D. Uji MR (*Methyl Red*)

Uji MR (*methyl red*) dilakukan untuk melihat kemampuan suatu bakteri dalam memfermentasikan asam campuran. Adapun hasil uji MR dapat dilihat pada gambar 4.6 dan tabel 4.8.



Gambar 4.6 Hasil uji MR. Keterangan A: isolat I1A Positif, B: isolat I2A Positif, C: isolat I1B negatif, D: isolat I2B Negatif.
(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2022)

Tabel 4.8 Hasil Uji MR (*Methyl red*)

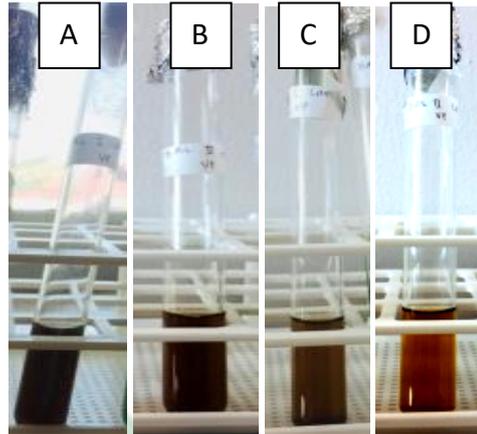
Isolat	Hasil Uji
I1A	Positif
I2A	Positif
I1B	Negatif
I2B	Negatif

Sumber Data pribadi, 2022

Dari hasil uji MR terhadap ke empat isolat diperoleh hasil positif pada isolat I1A, I2A dan hasil negatif pada isolat I2A dan I2B. Hasil uji MR dikatakan negatif apabila tidak terjadi perubahan warna pada media sedangkan hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna media menjadi merah atau terdapat cincin merah pada media (Cowan, 1993). Berdasarkan Cowan (1993) isolat bakteri yang menunjukkan hasil positif MR menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu memfermentasikan asam campuran, dalam hal ini berarti bakteri melakukan aktivitas metabolisme dengan cara mengubah senyawa glukosa menjadi asam piruvat hingga menghasilkan senyawa senyawa asam seperti asam laktat, asam format dan asam asetat (Aryal, 2018). Banyaknya senyawa asam yang dihasilkan mengakibatkan adanya penurunan pH pada media sehingga memicu perubahan warna pada media menjadi warna merah pada saat ditambahkan reagen *methyl red*. Sedangkan isolat bakteri yang tidak menunjukkan perubahan pada warna media menandakan bahwa tidak terjadi penurunan pH pada media dan bakteri tidak mampu memfermentasikan asam campuran (Tankeshwar, 2014)

E. Uji VP (*Voges Proskauer*)

Uji VP dilakukan dengan media yang mengandung pepton glukosa pospat. Tujuan dilakukannya uji VP dilakukan untuk melihat kemampuan suatu mikroba dalam membentuk senyawa asetoin (*acetyl methyl carbinol*) yang dihasilkan dari hasil fermentasi glukosa (Mac Faddin, 1980). Adapun hasil dari uji VP dapat dilihat pada gambar 4.7 dan tabel 4.9



Gambar 4.7 Hasil uji VP. Keterangan A: isolat I1A Negatif, B: isolat I2A Negatif, C: isolat I1B Negatif, D: isolat I2B Positif.
(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2022)

Tabel 4.9 Hasil Uji VP (*Voges Proskauer*)

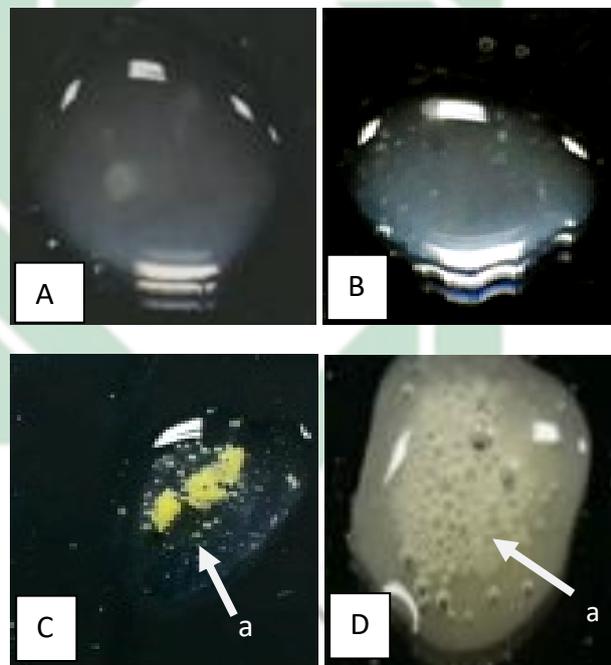
Isolat	Hasil Uji
I1A	Negatif
I2A	Negatif
I1B	Negatif
I2B	Positif

Sumber Data pribadi, 2022

Dari hasil uji biokimia VP dapat diketahui bahwa isolat I1A, I2A dan I1B diperoleh hasil uji VP negatif karena media tidak berubah warna menjadi merah setelah ditetesi reagen. Sedangkan pada isolat dengan kode I2B diperoleh hasil uji VP positif karena terjadi perubahan media menjadi warna merah setelah ditetesi reagen *alfa naftol* 5% dan reagen KOH 40%. Perubahan warna merah media pada saat uji VP dapat terjadi karena adanya kemampuan bakteri dalam mengubah glukosa menjadi asam piruvat melalui proses fermentasi pada saat metabolisme hingga menghasilkan senyawa *asetoin*. Penambahan reagen KOH pada uji VP bertindak sebagai pengoksidasi dan pengikat CO₂. Dengan adanya penambahan reagen *alfa naftol* dan KOH, memicu terjadinya oksidasi pada senyawa *asetoin* menjadi *diacetyl*. Selanjutnya senyawa *diacetyl* ini berikatan dengan senyawa guanidine yang terkandung dalam pepton, hingga memicu perubahan warna merah pada media (Pradan, 2014).

F. Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengidentifikasi suatu mikroba dalam menghasilkan enzim katalase sebagai pemecah senyawa hidrogen peroksida menjadi senyawa H_2O (dihidrogen oksida) dan O_2 (oksigen). Berdasarkan Djide dan Sartini (2008) indikasi bahwa suatu bakteri mampu menunjukkan hasil positif katalase adalah dengan adanya gelembung udara atau gas pada saat isolat bakteri ditambahkan H_2O_2 , sedangkan hasil negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung udara pada saat ditambahkan H_2O_2 . Adapun hasil dari uji katalase dapat dilihat pada gambar 4.8 dan tabel 4.10 dibawah ini.



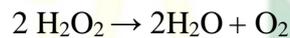
Gambar 4.8 Hasil uji katalase. Keterangan a: Gelembung reaksi katalase, A: isolat I1A Negatif, B: isolat I2A Negatif, C: isolat I1B Positif, D: isolat I2B Positif.
(Sumber: dokumentasi pribadi, 2022)

Tabel 4.10 Hasil Uji Katalase

Isolat	Hasil Uji
I1A	Negatif
I2A	Negatif
I1B	Positif
I2B	Positif

Sumber Data pribadi, 2022

Hasil dari uji katalase menunjukkan hasil katalase negatif pada isolat bakteri kode I1A dan I2A karena tidak ditemukan adanya gelembung gas yang terbentuk yang mengindikasikan bahwa bakteri bersifat anaerob, homofermentatif, tidak mampu mengurai H₂O₂ dan membentuk oksigen. Berdasarkan Yousef (2003) bakteri yang bersifat anaerob memiliki kemampuan mentolelir adanya oksigen dan bermetabolisme karbohidrat dengan jalur fermentasi. Sedangkan isolat I1B dan I2B menunjukkan adanya gelembung gas yang menunjukkan hasil uji katalase positif dan adanya gelembung gas tersebut mengindikasikan terbentuknya gas O₂. Hal tersebut sesuai dengan Raharjo (2012) bahwa enzim katalase adalah jenis enzim yang memiliki kemampuan dalam mengkatalis hidrogen peroksida H₂O₂. Adapun reaksi kimia hasil dari katalisasi enzim katalase dengan H₂O₂ sebagai berikut.



Umumnya bakteri mampu memproduksi suatu enzim katalase yang mampu memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂. Adapun mekanisme enzim katalase dalam memecah H₂O₂ dapat dilakukan pada saat terjadinya respirasi aerob. Pada saat melakukan respirasi aerob, bakteri mampu menghasilkan beragam jenis komponen salah satunya adalah H₂O₂ yang dapat bersifat toksik bagi bakteri, sebagai upaya pertahanan terhadap H₂O₂ yang bersifat toksik, mikroba yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim katalase akan memecah senyawa H₂O₂ (Hidrogen peroksida) menjadi H₂O (Dihidrogen oksida) dan O₂ (Oksigen) yang tidak bersifat toksik bagi mikroba (Raharjo, 2012).

4.2.4 Hasil Uji Aktivitas Amilolitik

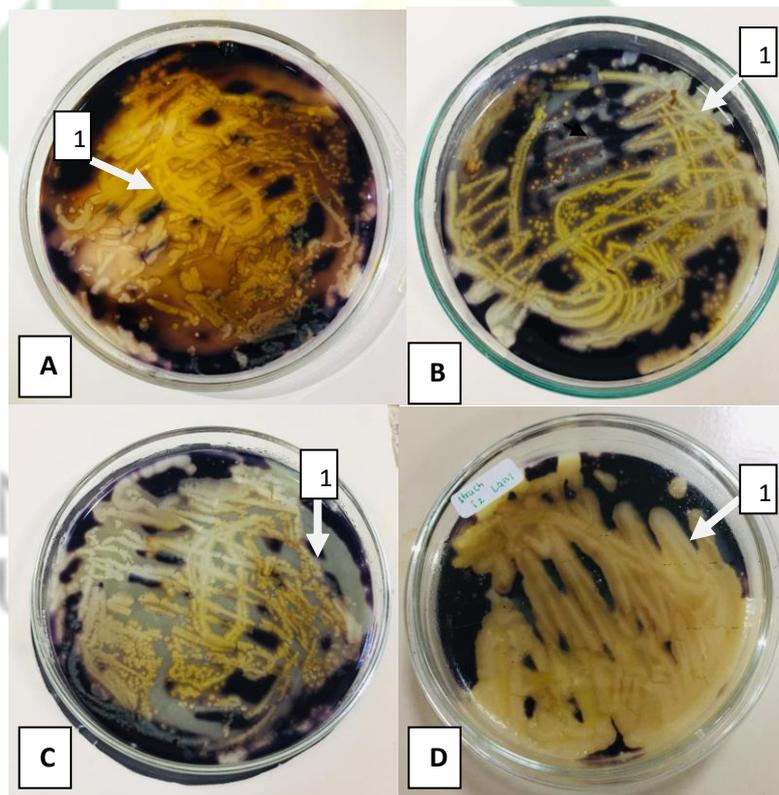
Uji aktivitas amilolitik atau yang biasa disebut dengan uji hidrolisis pati merupakan uji yang digunakan untuk melihat kemampuan suatu mikroorganisme dalam menghasilkan enzim amilase. Uji ini dilakukan dengan menggunakan media starch agar dan iodine sebagai indikator dari adanya aktivitas pemecahan pati menjadi glukosa (Kusumaningrum dkk.,

2015). Berdasarkan Sukarminah (2010) hasil uji hidrolisis pati positif dapat ditandai dengan adanya zona yang lebih jernih setelah ditetesi iodine disekitar daerah tumbuhnya mikroorganisme. Adapun uji hidrolisis pati seperti pada tabel 4.11 dan gambar 4.9

Tabel 4.11 Hasil Uji Aktivitas Amilolitik

Isolat	Hasil Uji
I1A	Positif
I2A	Positif
I1B	Positif
I2B	Positif

Sumber Data pribadi, 2022



Gambar 4.9 Uji aktivitas amilolitik. Keterangan 1: Zona bening, A: isolat I1A B: isolat I2A C: isolat I1B D: isolat I2B (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2022)

Dari hasil uji aktivitas amilolitik diperoleh hasil positif pada semua isolat yang ditandai dengan adanya zona jernih di sekitar bakteri yang tumbuh, hal tersebut berarti bahwa isolat bakteri tersebut memiliki

kemampuan dalam mengubah pati menjadi glukosa (Sukarminah, 2010). Adanya degradasi pati oleh bakteri dapat terjadi karena bakteri memerlukan sumber karbon bagi pertumbuhannya, sehingga bakteri tersebut dapat tumbuh dan memanfaatkan pati sebagai sumber karbon bagi pertumbuhannya (Putri *et al.*, 2012). Berdasarkan Murphy (2000) dalam pertumbuhannya, bakteri yang mampu mendegradasi pati, dan menggunakan pati sebagai sumber karbon, dapat menghasilkan enzim amilase ekstraseluler, adapun enzim ekstraseluler ini dapat memecah ikatan polimer dari zat tepung atau pati menjadi oligosakarida atau molekul gula yang lebih sederhana seperti glukosa, maltosa dan dekstrin.

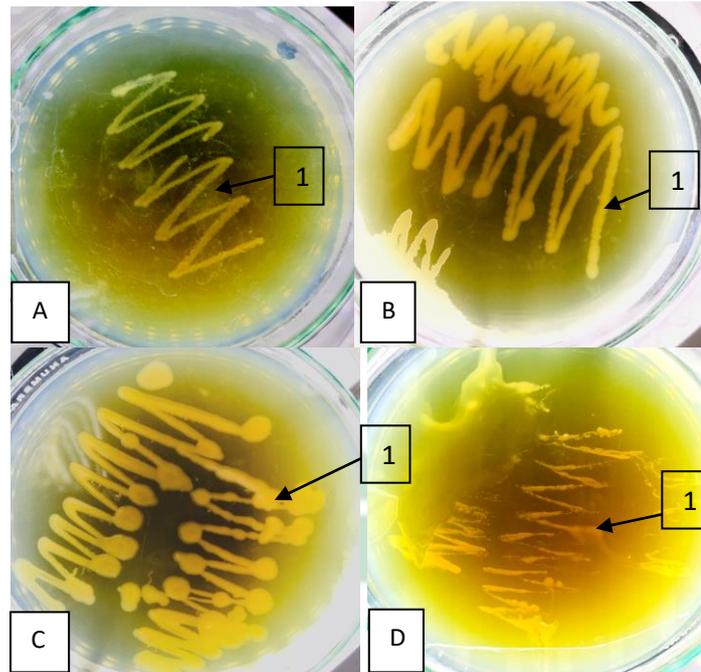
4.2.5 Hasil Uji Aktivitas Proteolitik

Uji aktivitas proteolitik dilakukan dengan menggunakan media skim milk agar. Media skim milk agar mengandung susu skim yang terdapat kandungan kasein yang difungsikan sebagai substrat enzim. Adapun kasein adalah protein susu yang tersusun dari kalsium yang berikatan dengan fosfoprotein dan membentuk kalsium kaseinat atau garam kalsium (Pakphan, 2009). Protease merupakan suatu jenis enzim yang mampu mengkatalisis pemecahan suatu ikatan peptida dalam polipeptida, peptida dan protein menjadi senyawa sederhana seperti asam amino ataupun peptida rantai pendek (Naiola dan Widyaastuti, 2002). Adanya aktivitas proteolitik dapat dilihat melalui zona jernih yang timbul disekitar daerah tumbuhnya bakteri. Zona jernih yang timbul dapat mengindikasikan bahwa bakteri mampu menghidrolisis kasein. Adapun hasil uji aktivitas proteolitik seperti pada tabel 4.12 gambar 4.10 berikut.

Tabel 4.12 Hasil Uji Aktivitas Proteolitik

Isolat	Hasil Uji
I1A	Positif
I2A	Positif
I1B	Positif
I2B	Positif

Sumber Data pribadi, 2022



Gambar 4.10 Uji aktivitas proteolitik. Keterangan 1: Zona bening A: isolat I1A B: isolat I2A C: isolat I1B D: isolat I2B (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2022)

Hasil dari uji aktivitas protease diperoleh hasil positif dikarenakan adanya zona jernih pada daerah yang ditumbuhi bakteri. Zona jernih dapat terbentuk karena kemampuan bakteri dalam mensekresikan enzim protease yang digunakan dalam proses hidrolisis kasein menjadi asam amino, adapun adanya aktivitas suatu enzim dalam menghidrolisis dapat dipengaruhi oleh berbagai macam faktor seperti konsentrasi substrat, enzim, suhu, pH, dan adanya inhibitor atau aktivator (Lehninger, 2005).

4.3 Penentuan Genus Bakteri Probiotik

Hasil dari isolasi bakteri berpotensi probiotik yang diisolasi dari usus dan lambung ikan lele diperoleh 4 isolat bakteri yang memiliki beberapa perbedaan karakteristik, baik dari segi morfologi secara makroskopis, mikroskopis ataupun secara biokimia. Adapun identifikasi dalam menentukan genus bakteri dilakukan dengan buku *Cowan and Steels Manual for the Identification of Medical Bacteria 2nd Edition*. Dari tahap identifikasi yang telah dilakukan didapatkan 4 jenis bakteri yang diduga berasal dari genus *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, dan *Bifidobacterium*. Dari beberapa

penelitian mengenai bakteri probiotik, juga ditemukan genus yang sama dengan keempat isolat bakteri yang teridentifikasi. Seperti pada penelitian Quiresa *et al* (2022) yang mengisolasi bakteri probiotik dari sampel usus ikan lele afrika, dari hasil penelitian tersebut dilakukan identifikasi secara mikroskopis dan makroskopis dan diperoleh jenis strain bakteri *Lactobacillus* sp. Pada penelitian Chao Ran (2013) memperoleh jenis strain bakteri genus *Bacillus* yang diisolasi dari sampel usus ikan lele, dan penelitian oleh Seerengaraj *et al* (2016) yang memperoleh beberapa jenis strain bakteri probiotik seperti bakteri *Lactobacillus* sp, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium* dan *Streptococcus* sp dari sampel saluran pencernaan beberapa jenis ikan, Selain itu dari penelitian oleh Manopo *et al* (2019) mendapati bahwa dalam saluran pencernaan ikan lele terdapat beberapa strain bakteri probiotik seperti *Lactobacillus* sp, juga beberapa jenis bakteri probiotik yang tergolong dalam genus *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*. Dari beberapa bukti penelitian tersebut dilakukan perbandingan karakteristik bakteri yang diisolasi dengan jenis bakteri yang terduga. Adapun dari hasil karakterisasi dan penentuan genus bakteri sebagai berikut.

a. Genus *Bifidobacterium*

Bakteri dengan kode isolat I1A merupakan isolat bakteri yang diisolasi dari usus ikan lele *Calarias* sp. Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan, diperoleh beberapa ciri morfologi seperti dari segi makroskopis bakteri I1A memiliki bentuk koloni bulat kecil berwarna putih bersih memiliki bentuk tepi entire dan bentuk elevasi convex atau cembung. Dari segi mikroskopis isolat bakteri I1A merupakan jenis bakteri gram positif dan berbentuk batang. Sedangkan dari hasil uji biokimia dapat diketahui bahwa bakteri isolat I1A merupakan bakteri non motil, bereaksi positif pada uji MR dan bereaksi negatif pada uji citrat, uji VP, dan katalase, dan memiliki aktivitas amilolitik dan proteolitik.

Hasil isolat kode I1A yang telah didapatkan tersebut memiliki kesamaan dengan bakteri yang berasal dari genus *Bifidobacterium*.

Berdasarkan buku *Cowan and Steels Manual for the Identification of Medical Bacteria*. *Bifidobacterium* merupakan bakteri yang dapat ditemukan pada saluran usus, rongga mulut, vagina, ataupun isi rumen hewan. Bakteri *Bifidobacterium* merupakan bakteri yang memiliki karakteristik menyerupai bakteri *Lactobacillus*, yang dapat memfermentasikan segala jenis gula menjadi asam laktat (Scardovi *et al.*, 1981). *Bifidobacterium* memiliki bentuk sel batang, berantai pendek, ataupun memiliki cabang sehingga menyerupai huruf Y, secara makroskopis bakteri ini memiliki ciri koloni berwarna putih mengkilap, dengan permukaan cembung (Yazawa, *et al.*, 2000). Bakteri ini termasuk kedalam golongan bakteri gram positif, bersifat non motil, tidak berspora, dan bereaksi katalase negatif (Holt, 1994). Bakteri *Bifidobacterium* memiliki kemampuan dalam menghasilkan bakteriosin dan asam organik sebagai zat antimikroba (Martines *et al.*, 2013). Berdasarkan Orla Jensen (1924) bakteri *Bifidobacterium* diklasifikasikan sebagai berikut.

Kingdom :Bacteria
 Filum :Actinobacteria
 Kelas :Actinobacteria
 Ordo :Bifidobacteriaes
 Famili :Bifidobacteriaceae
 Genus :*Bifidobacterium* (Orla Jensen, 1924)

Adapun perbandingan karakteristik bakteri yang diisolasi dengan karakteristik bakteri *Bifidobacterium* berdasarkan buku ”*Manual for Identification of Medical Bacteria*” (Cowan and Steels, 1993) seperti pada tabel 4.13 dibawah ini.

Tabel 4.13 Perbandingan isolat kode I1A dengan bakteri *Bifidobacterium*

Isolat	SC	Katalase	Motil	MR	VP	Amilolitik	Protease	Gram	Bentuk mikroskopis
I1A	-	-	NM	+	-	+	+	Positif	Basil
<i>Bifidobacterium</i> sp	-	-	NM	+	+	+	+	Positif	Basil

Isolat	Bentuk makroskopis	Warna	Tepian	Elevasi
I1A	Bulat	Putih	Entire	Convex
<i>Bifidobacterium</i> sp	Bulat	Putih/Cream	Entire	Convex

Keterangan: (+)= reaksi positif; (-)= reaksi negatif; NM= non motil, SC= *Simmon Citrat*, MR = *Methyl Red*, VP= *Voges Proskauer*

Bakteri dengan kode isolat I2A merupakan bakteri yang diperoleh dari organ usus. Secara karakteristik makroskopis bakteri ini memiliki ciri koloni berwarna putih susu, bentuk koloni berupa bulatan kecil dengan tepian entire dan bentuk permukaan pada bagian atas rata (flat). Secara mikroskopis, bakteri ini merupakan bakteri gram positif yang berbentuk batang. Dari hasil uji biokimia, bakteri isolat I2A bereaksi positif terhadap uji methyl red, bereaksi negatif katalase, mampu memfermentasikan glukosa, laktosa dan sukrosa, tidak bereaksi pada uji simmon citrat dan uji VP (*Voges proskauer*). Sedangkan dari aktivitas enzim amilolitik dan proteolitik diperoleh hasil positif yang berarti bakteri mampu menghidrolisis pati dan protein.

Dari uji yang telah dilakukan, selanjutnya dilakukan perbandingan isolat bakteri I2A dengan beberapa jenis bakteri probiotik, dari hasil tersebut diketahui bahwa isolat I2A memiliki kesamaan dengan bakteri yang berasal dari genus *Lactobacillus*. Berdasarkan buku *Cowan and Steels Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Bakteri genus *Lactobacillus* termasuk dalam golongan bakteri gram positif, tidak membentuk spora, tidak memiliki alat gerak atau bersifat motil, fakultatif anaerob. Berdasarkan Ray (2001) bakteri *Lactobacillus* memiliki bentuk sel berbentuk batang dengan ukuran sel yang sangat beragam, beberapa dari bentuk selnya ada yang memanjang dan ada yang berbentuk batang membulat. Genus *Lactobacillus* merupakan bakteri non patogen yang umumnya tersebar pada membran mukosa dari hewan, sayuran, dan produk makanan fermentasi (Stamer, 1979). Berdasarkan Beijerinck (1901) bakteri genus *Lactobacillus* diklasifikasikan sebagai berikut.

Kingdom :Bacteria
 Filum :Firmicutes
 Kelas :Bacilli
 Ordo :Lactobacillales
 Famili :Lactobacillaceae
 Genus :*Lactobacillus* (Beijerinck, 1901)

Adapun perbandingan karakteristik bakteri yang diisolasi dengan karakteristik bakteri *Lactobacillus* berdasarkan buku ”*Manual for Identification of Medical Bacteria*” (Cowan and Steels, 1993) seperti pada tabel 4.14

Tabel 4.14 Perbandingan isolat kode I2A dengan bakteri *Lactobacillus*

Isolat	SC	Katalase	Motil	MR	VP	Amilolitik	Protease	Gram	Bentuk mikroskopis
I2A	-	-	NM	+	-	+	+	Positif	Basil
<i>Lactobacillus</i> sp	-	-	NM	+	-	+	+	Positif	Basil

Isolat	Bentuk makroskopis	Warna	Tepian	Elevasi
I2A	Bulat	Putih	Entire	Flat
<i>Lactobacillus</i> sp	Bulat	Putih	Entire	Flat

Keterangan: (+)= reaksi positif; (-)= reaksi negatif; NM= non motil, SC= *Simmon Citrat*, MR = *Methyl Red*, VP= *Voges Proskauer*

c. Genus *Micrococcus* sp

Bakteri dengan kode isolat I1B merupakan bakteri yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan lele pada bagian lambung. Dari hasil identifikasi secara makroskopis bakteri ini memiliki ciri koloni berwarna kuning, bentuk koloni bulat dan elevasi flat. Sedangkan dari pengamatan secara mikroskopis bakteri I1B merupakan bakteri gram positif yang berbentuk coccus atau bulat. Dari hasil uji biokimia, isolat I1B bereaksi positif katalase, bereaksi negatif pada uji simmon citrat dan MRVP.

Bakteri dengan kode isolat I1B mampu memfermentasikan glukosa pada TSIA, dan memiliki aktivitas amilolitik dan proteolitik.

Isolat kode I1B yang telah didapatkan tersebut memiliki kesamaan dengan bakteri yang berasal dari genus *Micrococcus*. Berdasarkan buku *Cowan and Steels Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Bakteri *Micrococcus* merupakan bakteri gram positif, tidak memiliki alat gerak atau non motil, dan bereaksi positif terhadap katalase, bersifat anaerob, mampu memfermentasi glukosa atau laktosa pada uji TSIA, tidak memetabolismekan citrat sebagai sumber karbon, dan tidak memfermentasikan asam campuran pada uji biokimia MRVP (Holt *et al.*, 2005). Berdasarkan penelitian (Vine *et al.*, 2004) bakteri *Micrococcus* merupakan bakteri yang memiliki kemampuan untuk hidup pada saluran pencernaan ikan, tidak bersifat patogen, dan memiliki potensi sebagai bakteri probiotik karena dianggap menguntungkan dan dapat digunakan dalam mencegah penyakit pada ikan (Suwarsih, 2011). Bakteri *Micrococcus* diklasifikasikan sebagai berikut.

Kingdom :Bacteria

Filum :Actinobacteria

Kelas :Actinobacteria

Ordo :Actinomycetales

Famili :Micrococcaceae

Genus :*Micrococcus* (Cohn, 1872)

Adapun perbandingan karakteristik bakteri yang diisolasi dengan karakteristik bakteri *Micrococcus* berdasarkan buku "*Manual for Identification of Medical Bacteria*" (Cowan and Steels, 1993) seperti pada tabel 4.15

Tabel 4.15 Perbandingan isolat kode I1B dengan bakteri *Micrococcus*

Isolat	SC	Katalase	Motil	MR	VP	Amilolitik	Protease	Gram	Bentuk mikroskopis
I1B	-	+	NM	-	-	+	+	Positif	Coccus
<i>Micrococcus</i> sp	-	+	NM	-	-	+	+	Positif	Coccus

Isolat	Bentuk makroskopis	Warna	Tepian	Elevasi
I1B	Bulat	Kuning	Entire	Flat
<i>Micrococcus</i> sp	Bulat	Kuning	Entire	Flat

Keterangan: (+)= reaksi positif; (-)= reaksi negatif; NM= non motil, SC= *Simmon Citrat*, MR = *Methyl Red*, VP= *Voges Proskauer*

d. Genus *Bacillus* sp

Bakteri dengan kode isolat I2B merupakan bakteri yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan lele pada bagian lambung. Adapun bakteri ini memiliki beberapa ciri yaitu, dari segi morfologi makroskopis bakteri ini memiliki bentuk koloni bulat, berwarna kekuningan, dengan tepian berbentuk tidak teratur dan elevasi yang datar atau flat. Bakteri dengan kode isolat I2B merupakan bakteri gram positif yang berbentuk batang, sedangkan dari hasil uji biokimia dapat diketahui bahwa bakteri ini bersifat motil, reaktif terhadap uji simmon citrat positif, reaksi katalase positif, reaksi uji MR negatif dan uji VP positif, dan bakteri ini memiliki aktivitas amilolitik dan proteolitik.

Hasil isolat kode I2B yang telah didapatkan tersebut memiliki kesamaan dengan bakteri yang berasal dari genus *Bacillus* sp. Berdasarkan buku *Cowan and Steels Manual for the Identification of Medical Bacteria*, bakteri yang masuk ke dalam genus *Bacillus* merupakan jenis bakteri gram positif yang memiliki ciri-ciri morfologi berbentuk batang, beberapa jenis bakteri bergenus *Bacillus* ada yang bersifat motil dan non motil, jika di uji katalase menunjukkan hasil positif dengan adanya gelembung gas, sebagian jenis bakteri *Bacillus* memiliki kemampuan dalam memfermentasikan glukosa, bertahan hidup secara aerobik ataupun fakultatif anaerobic dan mampu membentuk endospora (Holt, 1994). Dari segi morfologi makroskopis, Berdasarkan Holt, (1994) bakteri *Bacillus* memiliki bentuk koloni berwarna putih hingga kekuningan, memiliki ukuran besar hingga kecil, membentuk koloni yang tidak beraturan, dan memiliki elevasi datar. Bakteri *Bacillus* juga merupakan bakteri yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan

enzim seperti enzim amilase, enzim protease ataupun enzim lipase (Rahayu,1990) Berdasarkan (Cohn, 1872) bakteri *Bacillus* diklasifikasikan sebagai berikut.

Kingdom :Bacteria
 Filum :Firmicutes
 Kelas :Bacili
 Ordo :Bacilales
 Famili :Bacillaceae
 Genus :*Bacillus* (Cohn, 1972)

Adapun perbandingan karakteristik bakteri yang terduga dengan karakteristik bakteri *Bacillus* berdasarkan buku "Manual for Identification of Medical Bacteria" (Cowan and Steels, 1993) seperti pada tabel 4.16 dibawah ini.

Tabel 4.16 Perbandingan isolat bakteri kode I2B dengan bakteri *Bacillus*

Isolat	SC	Katalase	Motil	MR	VP	Amilolitik	Protease	Gram	Bentuk mikroskopis
I2B	+	+	M	-	+	+	+	Positif	Basil
<i>Bacillus</i> sp	d	+	M	D	-	+	+	Positif	Basil

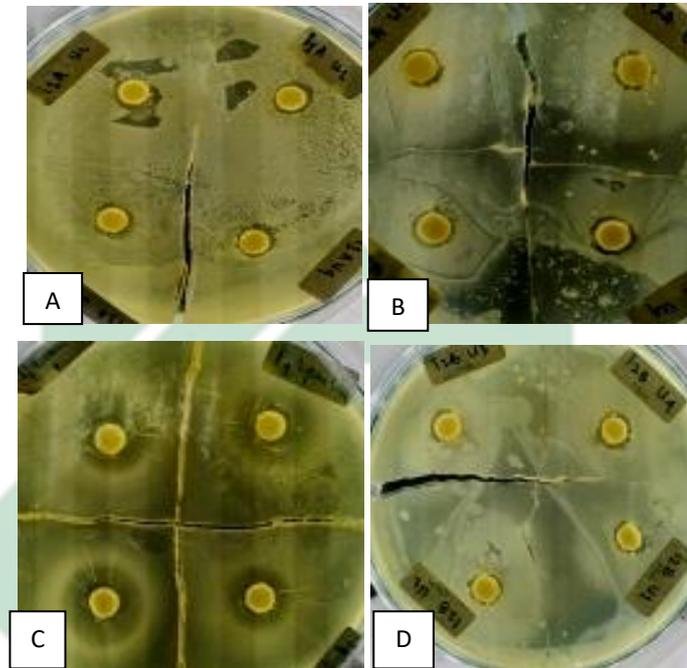
Isolat	Bentuk makroskopis	Warna	Tepian	Elevasi
I2B	Bulat	Kuning	Entire	Convex
<i>Bacillus</i> sp	Bulat	Kuning	Entire	Convex

Keterangan: d = Dapat menunjukkan reaksi positif ataupun negatif tergantung dari jenis spesies, (+)= reaksi positif; (-) reaksi negatif; M= motil, SC= *Simmon Citrat*, MR = *Methyl Red*, VP= *Voges Proskauer*

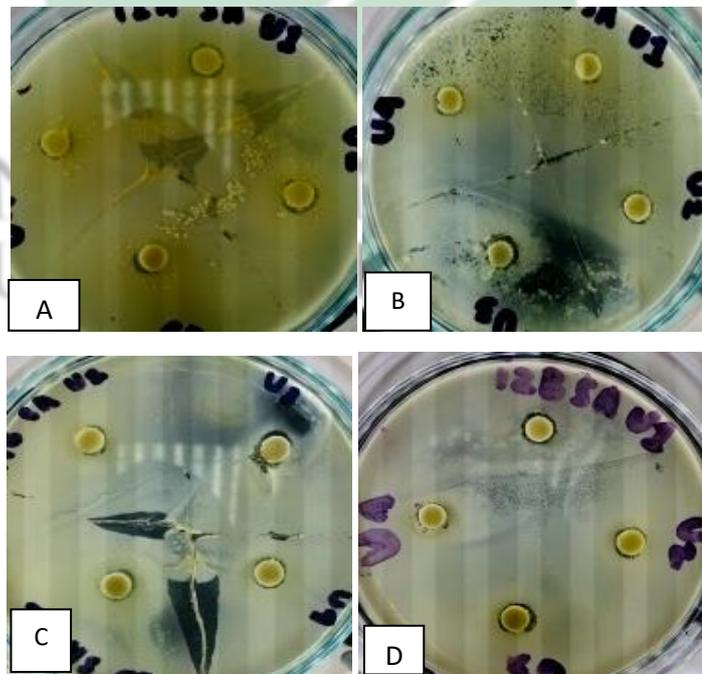
4.4 Daya Hambat Bakteri Probiotik Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Kemampuan bakteri probiotik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dapat dilihat melalui ada tidaknya zona bening disekitar kertas cakram. Apabila disekitar kertas cakram terdapat zona bening yang terbentuk hal tersebut mengindikasikan bahwa bakteri probiotik yang diisolasi memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus*

aureus. Untuk menentukan besarnya kemampuan bakteri dalam menghambat, dilakukan pengukuran terhadap zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong. Adapun hasil dari zona hambat yang terbentuk dapat dilihat pada tabel 4.17, gambar 4.11 dan 4.12



Gambar 4.11 Daya hambat bakteri probiotik terhadap bakteri *Escherichia coli* A: isolat I1A B: isolat I2A C: isolat I1B D: isolat I2B (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2022)



Gambar 4.12 Daya hambat bakteri probiotik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* A: isolat I1A B: isolat I2A C: isolat I1B D: isolat I2B (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2022)

Tabel 4.17 Hasil pengukuran diameter zona hambat bakteri probiotik terhadap bakteri uji

Kode isolat	Diameter luas zona hambat (mm)	
	Diameter zona hambat <i>E.coli</i>	Diameter zona hambat <i>S. Aureus</i>
	Rata-rata ± Std. Deviasi	Rata-rata ± Std. Deviasi
I1A	8,25 ± 0,433	8,5 ± 0,5
I2A	8,5 ± 0,5	7,5 ± 0,5
I1B	8,75 ± 0,433	7,25 ± 0,433
I2B	8,5 ± 0,5	7,5 ± 0,5

(Sumber: Data Pribadi, 2022)

Setelah data diameter zona hambat telah diperoleh, selanjutnya dilakukan uji secara statistik. Apabila data berdistribusi normal, uji statistik dapat dilakukan dengan uji one way anova, apabila data yang diperoleh tidak berdistribusi normal, dapat dilanjutkan dengan uji Kruskal wallis. Dari hasil uji normalitas diperoleh hasil seperti pada tabel 4.18

Tabel 4.18 Hasil uji normalitas

Bakteri uji	Nilai Asymp. sig (uji normalitas)				α
	Isolat I1A	Isolat I1B	Isolat I2A	Isolat I2B	
<i>E. Coli</i>	.001	.024	.001	.024	0,05
<i>S. aureus</i>	.024	.024	.024	.024	0,05

(Sumber: Data pribadi, 2022)

Pada tabel 4.18 dapat diketahui bahwa data yang diperoleh tidak berdistribusi normal karena nilai Asymp. sig yang diperoleh 0,01 dan 0,024 (<0,05) yang berarti nilai *p value* kurang dari nilai signifikansi $\alpha=0,05$. Karena data yang diperoleh tidak berdistribusi normal, dan tidak memenuhi syarat untuk uji one way anova, maka uji statistik dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*. Adapun hasil dari uji *Kruskal Wallis* dapat dilihat pada tabel 4.19

Tabel 4.19 Hasil uji Kruskal Wallis

Bakteri uji	Nilai Asymp. sig	α
<i>E. Coli</i>	.187	0.05
<i>S. aureus</i>	.072	0.05

(Sumber: Data pribadi, 2022)

Dari hasil uji *Kruskal Wallis* diperoleh nilai *Asymp. Sig* 0,187 pada daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan nilai *Asymp. Sig* 0,072 pada daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus* yang berarti nilai sig lebih besar dari nilai $\alpha=0,05$ ($>0,05$) dan dapat disimpulkan bahwa H_0 diterima yang berarti tidak terdapat perbedaan signifikan terhadap diameter zona hambat yang terbentuk. Tidak adanya perbedaan zona hambat yang signifikan dapat dipengaruhi oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Berdasarkan (Dhony, 2014) terbentuknya diameter zona hambat yang dapat dipengaruhi oleh perbedaan konsentrasi produksi zat antibakteri yang dihasilkan bakteri probiotik hingga kolonisasi bakteri probiotik.

Dari hasil uji daya hambat bakteri probiotik terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, dapat diketahui bahwa semua isolat bakteri probiotik tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan kategori *range* resisten. Adapun penentuan *range* atau tingkat kemampuan hambat berpatok pada *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol* seperti pada tabel dibawah ini

Diameter zona hambat	<i>Range</i>
<13 mm	<i>Resistant</i> (Resisten)
14-16 mm	<i>Intermediate</i> (Sedang)
>17	<i>Susceptible</i> (Rentan)

Perhitungan luas daya hambat dilakukan dengan mengukur luas zona bening secara keseluruhan dan dikurangi dengan diameter kertas cakram sebesar 6 mm. Dari hasil pengukuran kemampuan daya hambat bakteri probiotik terhadap bakteri uji gram negatif *Escherichia coli* dengan jangka

tersebut dapat diketahui bahwa isolat dengan kode I2A merupakan isolat bakteri yang memiliki diameter hambat terbesar dibandingkan isolat I1A, I1B dan I2B. pada isolat I2A mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* hingga mencapai diameter rata-rata 8,75 mm. Isolat I2A merupakan bakteri yang terduga berasal dari genus *Micrococcus*. Berdasarkan Wardani., *et al* (2013) bakteri *Micrococcus* memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan kategori range resisten hingga intermediate. Berdasarkan Subagio *et al* (2010) Bakteri *Micrococcus* merupakan bakteri yang berpotensi sebagai probiotik. Potensi probiotik dari bakteri *Micrococcus* dapat dibuktikan melalui kemampuannya dalam menghambat bakteri patogen.

Bakteri *Micrococcus* merupakan bakteri yang memiliki tipe fermentasi heterofermentatif yang mampu menghasilkan asam, gas CO₂, dan alkohol dari sisa hasil metabolismenya (Yanti dan Dali, 2013). Penghambatan luas pada bakteri gram negatif *Escherichia coli* dapat terjadi karena adanya kondisi pH yang rendah akibat asam organik yang dihasilkan oleh bakteri probiotik dan dapat dipengaruhi oleh sifat bakteri gram negatif rentan terhadap asam. Adapun jenis asam organik yang dihasilkan oleh bakteri probiotik pada umumnya seperti asam laktat, asam asetat dan asam propionate (Winarno, 1997). Asam asetat atau yang biasa dikenal dengan asam cuka merupakan asam organik yang menjadi agen antimikroba atau penghambat utama yang juga memiliki spectrum hambat luas terhadap bakteri, khamir ataupun kapang, begitupun juga dengan asam propionate yang mampu menghambat beberapa jenis khamir ataupun kapang (Hart *et al*, 2003) sedangkan asam laktat merupakan asam organik yang memiliki peran sebagai agen pereduksi kadar pH (Owehand dan Vesterlund dalam Salminen, 2004).

Mekanisme agen antimikroba dalam mematikan ataupun menghambat pertumbuhan bakteri dapat dilakukan melalui perusakan dinding sel hingga terjadi lisis, menghambat sintesis protein dan menghambat pembentukan asam nukleat, menghambat kerja enzim dengan merubah permeabilitas dari

membran sitoplasma hingga memicu terjadinya kebocoran nutrient (Pelczar, 1993). Selain memproduksi asam, bakteri *Micrococcus* mampu menghasilkan karbondiosida (CO_2) yang dapat menyebabkan kondisi anaerobik yang menghambat dekarboksilase yang dapat menyebabkan menurunnya permeabilitas. Adanya karbondioksida tersebut dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri patogen (Lestari dan Helmyati, 2015).

Sedangkan dari hasil pengukuran diameter hambat bakteri probiotik terhadap bakteri uji gram positif *Staphylococcus* diperoleh hasil bahwa isolat kode I1A yang didapatkan dari organ usus memiliki diameter hambat lebih besar dibandingkan dengan isolat I1B, I2A dan I2B. Bakteri dengan kode I1A merupakan bakteri probiotik yang terduga berasal dari genus *Bifidobacterium*. Jenis bakteri *Bifidobacterium* merupakan salah satu dari jenis bakteri asam laktat yang telah banyak digunakan pemanfaatannya sebagai agen probiotik. Bakteri *Bifidobacterium* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan rata-rata diameter 8,5 mm. Kemampuan bakteri *Bifidobacterium* dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji dapat dipengaruhi oleh kemampuan produksi bakteriosin yang bersifat antimikroba (Adetunji, 2007). Selain menghasilkan senyawa asam dari hasil metabolisme, bakteri *Bifidobacterium* memiliki kemampuan menghasilkan senyawa bakteriosin yang dihasilkan dari proses sintesis didalam ribosom (Firdaus, *et al*, 2020). Secara umum, bakteriosin adalah ekstraseluler yang dilepaskan oleh peptide atau protein yang bersifat bakterisidal, Adanya senyawa bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri probiotik dapat berdampak pada penghambatan bakteri patogen melalui mekanisme pembentukan porin pada dinding sel bakteri patogen hingga berdampak pada permeabilitas membran sel (Aslam *et al*, 2011) adanya interaksi antara bakteriosin dan gugus fosfat pada membran sel menyebabkan terjadinya penetrasi bakteriosin melalui dinding sel bakteri, proses tersebut mengakibatkan terjadinya pengikatan bakteriosin pada membran sel, yang dapat menyebabkan ketidakstabilan membran sitoplasma hingga memicu terbentuknya pori (Firdaus *et al*, 2020). Menurut Manalu, *et al* (2020), Terbentuknya pori pada sel mengakibatkan adanya kebocoran sel hingga

terjadinya penurunan pada pH karena adanya pelepasan molekul intraseluler dan masuknya molekul ekstraseluler yang dapat mengakibatkan penghambatan pada bakteri patogen dan dapat memicu kesensifian terhadap bakteriosin hingga mengakibatkan kematian pada bakteri (Firdaus, *et al*, 2020).

Pada perakuan kontrol positif menggunakan *chloramphenicol* 5% menunjukkan zona hambat yang luas, hal tersebut dapat terjadi karena *chloramphenicol* merupakan antibiotik yang memiliki sifat bakteristatik dan bakterisidal sehingga sangat efektif dalam menghambat dan mematikan mikroba (Lenni, 2018) sedangkan pada kontrol negatif menggunakan NaCl fisiologis tidak menunjukkan adanya zona hambat, hal ini dikarenakan NaCl merupakan pelarut yang bersifat netral, penggunaan NaCl sebagai kontrol negatif digunakan untuk menunjukkan bahwa zona hambat yang terbentuk bukan karena adanya pengaruh zat pelarut akan tetapi murni dari adanya aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh bakteri probiotik.

Dari hasil perhitungan terhadap zona hambat diperoleh rata-rata hambatan yang berbeda. Perbedaan besar kecilnya daya hambat terhadap bakteri uji dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah perbedaan struktur dari bakteri gram positif dan negatif. Berdasarkan Mc Kane dan Kandel (1985) sel bakteri gram positif tersusun dari asam teikoat, asam lipoteikoat dan sedikit peplidoglikan (Pratiwi, 2008) sedangkan pada bakteri gram negatif memiliki peptidoglikan yang lebih sedikit akan tetapi memiliki struktur sel yang kompleks seperti lipoprotein pada lapisan luar, polisakarida pada lapisan bagian tengah dan peptidoglikan pada lapisan bagian dalam (Pelczar and Chan, 1982). Berdasarkan Nychas (2000) pada bakteri gram positif, zat antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri probiotik dapat langsung masuk mengisi peptidoglikan dan berikatan langsung dengan protein hingga menyebabkan bakteri lisis, sedangkan pada bakteri gram negatif zat antibakteri masuk melalui lapisan luar bakteri, selanjutnya masuk untuk mengisi peptidoglikan hingga membentuk ikatan dengan protein hingga bakteri mengalami lisis. Kemampuan antagonistik suatu mikroba dalam menghambat bakteri yang tidak diinginkan juga dapat dipengaruhi beberapa

faktor seperti jenis bakteri, umur, jumlah, suhu, waktu, konsentrasi zat antimikroba, dan karena adanya faktor fisika dan kimia yang mempengaruhi seperti pH, kadar garam, zat terlarut dan senyawa kimia (Frazier and Westhoff, 1998).

Selain menghasilkan senyawa antimikroba yang dapat membunuh dan menghambat bakteri patogen, dalam kehidupan sehari-hari adanya bakteri probiotik juga memiliki berbagai manfaat salah satunya adalah untuk suplemen ransum untuk ternak Berdasarkan penelitian (Sumarsih., dkk, 2012) terbukti bahwa dengan adanya penambahan bakteri probiotik pada ransum dapat meningkatkan tingkat produktivitas ternak, selain itu penggunaan bakteri probiotik seperti *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* dapat dimanfaatkan sebagai bahan tambahan pangan yang tentunya mengandung berbagai manfaat seperti membantu memperlancar sistem pencernaan, mengendalikan kolestrol, hingga merangsang respon sistem kekebalan tubuh. Dalam potongan Q.S Al-Imran ayat 191 Allah berfirman :

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya: “Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia; Mahasuci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka.

Berdasarkan tafsir M. Quraish Shihab (2012), di dalam surah Al-Imran ayat 191 menjelaskan mengenai keagungan dan kebesaran Allah SWT. Dalam ayat ini Allah menegaskan bahwa seluruh isi langit dan bumi merupakan milik Allah SWT, dan sebagai manusia atau salah satu makhluk ciptaan Allah dianjurkan untuk mempelajari, dan mengenali sifat Allah yang maha kaya, agung, dan mulia. Dari potongan ayat surah Al-Imran ayat 191, dapat diketahui bahwa Allah SWT merupakan sebaik-baiknya pencipta, dan segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah, kehadirannya tidak akan sia-sia dan memiliki manfaat dibalikinya. Mikroorganisme probiotik merupakan salah-satu tanda bukti makhluk hidup ciptaan Allah yang kehadirannya memiliki manfaat bagi makhluk hidup lain. Manusia dikaruniai anugerah

berupa akal oleh Allah SWT semata-mata agar manusia mampu berfikir, mencari ilmu, hingga mengkaji petunjuk-petunjuk yang diberikan Allah SWT melalui Al-Qur'an ataupun As-Sunnah.



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas antibakteri dari isolat bakteri probiotik yang diisolasi dari usus dan lambung ikan lele (*Clarias* sp) mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif *Escherichia coli*, adapun zona hambat tertinggi pada penghambatan diperoleh dari isolat bakteri *Micrococcus*.
2. Aktivitas antibakteri dari isolat bakteri probiotik yang diisolasi dari usus dan lambung ikan lele (*Clarias* sp) mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif *Staphylococcus aureus*, adapun zona hambat tertinggi pada penghambatan diperoleh dari isolat bakteri *Bifidobacterium*.

5.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai jenis-jenis bakteri probiotik yang memiliki kemampuan daya hambat bakteri yang lebih besar terhadap bakteri patogen.
2. Disarankan dilakukan identifikasi lebih lanjut dengan menggunakan identifikasi secara molekuler untuk menentukan suatu spesies bakteri probiotik.
3. Disarankan uji efektivitas terkait bakteri probiotik dari usus dan lambung terhadap pertumbuhan ikan lele.

DAFTAR PUSTAKA

- Adetunji. 2007. Bacteriocin and Cellulose Production by Lactid Acid Bacteria Isolated. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 6 (22),pp. 2616-2619.
- Afiati, F. Y., dan R. A. Maheswari. 2014. Pemanfaatan Bakteri Probiotik Indigenus Dalam Pembuatan Keju Lunak. *Jurnal Teknologi Industri Pangan*. 25 (1): 715
- Andi, Nikhlani. 2021. *Modul Fisiologi dan Tingkah Laku Ikan (Pencernaan Ikan)*. Jurusan Budidaya Perairan. Universitas Mulawarman
- Andrianto, I.T.T. 2005. *Pedoman Praktis Budidaya Ikan Lele*. Absolut, Yogyakarta.
- Anggie, I. A. 2019. Uji Aktivitas Antibakteri dari Probiotik Yang Terdapat Dalam Dengke Naniura Hasil Fermentasi Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Terhadap *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli*. *Skripsi*. Fakultas Farmasi, Universitas Sumatera Utara.
- Arfiandi. A. 2016. Kemampuan Tumbuh Isolat Bakteri Asam Laktat Asal Saluran Pencernaan Broiler Umur Tiga Hari Pada Berbagai Uji Probiotik. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Alauddin Makassar.
- Aryal, S., 2018. *Methyl Red (MR) Test Principle, Procedure and Result Interpretation*. [Online] Availableat: <https://microbioloyinfo.com> [Diakses pada 20 Oktober 2022].
- Aslam M, Shahid M, Rehman FU, Naveed NH, Batool AI, Sharif S, dan Asia A, 2011. Purification and Characterization of Bacteriocin Isolated from *Streptococcus thermophilus*. *African Journal of Microbiology Research*. 5(18): 2642-2648.
- Badan Standardisasi Nasional (BSN). 2015. *SNI 2332.9: Cara Uji Mikrobiologi Bagian 9. Penentuan Staphylococcus aureus Pada Produk Perikanan*. Jakarta (ID): Badan Standar nasional.
- Benson. 2001. Microbiological Applica- tions. *Laboratory Manual in General Microbiology*. Eighth Edition. McGraw-Hill Science Company : New York. pp. 72-175.
- Bernett M-F, Brassart D, Neeser J-R, and Servin AL. 1997. Adhesion of Human Bifidobacterial Strains to Cultured Human Intestinal Epithelial Cells and Inhibition of Enteropathogen-cell Interactions. *Appl. Environ. Microbiol*. 59(12) : 2124-2128
- Billah, R. A.2020. Pengaruh Ekstrak Buah Majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap Mortalitas dan Diferensial Leukosit Ikan Lele Pasca Uji Tantang dengan

- Bakteri *Aeromonas hydrophyla*. Thesis. Fakultas Pertanian dan Perikanan. Universitas Muhammadiyah Gresik.
- Brooks, G.F., Janet, S. B., dan A. M. Stephen. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran (Alih bahasa)*. Salemba Medika.
- Brooks, G.F., Janet, S.B., Stephen A.M. 2005. Jawetz, Melnick and Adelbergs, *Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology) Buku I*, Alih Bahasa oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E.B., Mertaniasih, N.M., Harsono, S., dan Alimsardjono, L. Jakarta : Salemba Medika. pp. 317-25, 358-60.
- Buckle, K. A., Edwards, E. A., Fleet, G. H., dan M. Wotton. 2007. *Ilmu Pangan (Terjemahan dari Hari Purnomo dan Adiono)*, Universitas Indosensia Press. Jakarta.
- Cappucino, J. G. 1983. *Microbiology : A Laboratory Manual*. Addison Wesley Publishing Company.
- Cappuccino, J.G. & Sherman, N. 1987. *Microbiology: A Laboratory Manual*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Clifornia.
- Carter, G. R., and D. J. Wise. 2004. *Essential of Veterinary Bacteriology and Mycology 6th Edition*. Blackwell Publishing.
- Chao Ran. 2013. Isolation and Characterization of *Bacillus* spp. As Potential for Channel Catfish *Ictalurus punctatus*. *Dissertation*. Faculty of Auburn University.
- Chotiah, S. 2009. *Cemaran Staphylococcus aureus Pada Daging Ayam Dan Olahannya*. Balai Besar Penelitian Veteriner. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner: 682-687.
- Cowan, S.T., and D. Steels. 1973. *Manual for Identification Medical Bacteria. Cambridge 2nd Ed*. Cambridge University Press. London
- Cowan, S.T and Steel, K.J. 1993. *Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria. 3rd Edition*. Cambridge University Press. 199-241.
- Dhony. N. S. 2014. Perbedaan Pengaruh Antara Probiotik A, B, C Terhadap Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Kajian In Vitro). *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Djide, M. Natsir, dan Sartini. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Farmasi*. Lembaga Penerbitan UnHas. Makassar.
- Dp. Holt, J.G., N.R . Krieg., P.H.A . Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual's of Getermination Bacteriology*. William & wilkins, Baltimore, Marryland
- Dwiyanti. R. 2016. Mutu Bakteriologis Saus Tomat Pentol di Banjar baru. *Medical Laboratory Technology Journal*. Vol 2 (1).
- Garbutt. 1997. *Essential of food microbiology*. London :Arnold.

- Gildberg. A., Mikkelsen. H., Sandaker. E., Ringo. E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*. 352: 297-285.
- Fardiaz, S. (1992). *Mikrobiologi Pangan I*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Feliatra, I. Efensi., dan E. Suryadi. 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephginephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. *Jurnal Natur Indonesia*. Vol 6 (2): 75-80.
- Firdaus MR, Putra AE, dan Abdiana A, 2020. Potensi Aktivitas Bakteriosin *Lactobacillus Gasseri* Terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi*. *Jurnal Ilmu Kesehatan Indonesia*; 1(3): 314-320.
- Frazier, W. C and D. C. Westhoff. 1998. *Food Microbiology 4th Edition*. Mc Graw Hill International Edition.
- Fuller, R. 1992. *Histology and Development of Probiotic dalam Fuller editor Probiotic the Scientific Basic*. London Chapman and Hall 1-8. London.
- Ganesha, H., dan S. M. Wibawa. 2016. *Probiotik*. Fakultas Kesehatan. Universitas Udayana.
- Hafsan, S., 2014. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Dasar*. Universitas Alaudin Press.
- Harlina. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Usus Itik (*Anas domestica*). *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Alauddin Makassar.
- Hart, H., Craine, L. E., dan Hart, D. J. 2003. *Kimia Organik : Suatu Kuliah Singkat*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Helfrich, W., and D. Westhoff. 1980. *All About Yogurt*. Prentice Hall. Inc. Englewood Cliff. New Jersey.
- Holt. G., Kreig, N.R. Sneath, P.H.A. Stanley, J.T., William. 1994. *Bergeys Manual Determinative Bacteriology*. Baltimore. William and Wilkins Baltimore.
- Hudzicki, J. 2009. *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. American Society for Microbiology
- Irianto, A. 2003. *Probiotik Akuakultur*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Jawetz, E. J. K., Melnick, E. A., Adelberg, G. F., Brooks, J. S., and L. N. Ornston. 1995. *Mikrobiologi Kedokteran*. ed 20. University California, San Fransisco.
- Jawetz, E., Melnick, J.L., and E. A. Adelberg. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran (Terjemah oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E. B., Mertaniasih, N., Harsono, Alimsardjono, L. Edisi XXII*. 327-335, 362-363. Salemba Medika. Jakarta

- Kasi, PD., Ariandi., H. Mutmainnah. 2017. Uji Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Limbah Cair Sagu terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal Biotropika*. Vol 5 (1): 97-98.
- Kristianti, N. D., Warnaen, A., dan D. R. A. Daning. 2017. Titik Kontrol Kritis Pada Pengolahan Susu Pasteurisasi di Koperasi Unit Desa (KUD) Dau Kabupaten Malang. *Jurnal Sains dan Peternakan*. Vol 15 (1): 1-7.
- Kurniasih, T., Widarni., Mulyasari., Melati, I., Azwar, Z., dan Lusaaastuti, A.M. 2014. Isolasi Seleksi dan Identifikasi Bakteri dari Saluran Pencernaan Ikan Lele sebagai Kandidat Probiotik. *Jurnal Riset Akuakultur*. Vol 8 (2): 277:286.
- Lehninger, A.L., 2005, Principles of Biochemistry, fourth edition, Academic Press, New York.
- Lenni. 2018. Isolasi Bakteri Kandidat Probiotik dari Usus Ikan Geodok (*Periophthalmus argentilineatus*) Sebagai Pengendalian *Vibrio parahaemolyticus* secara In Vitro. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Borneo Trakan.
- MacFaddin, J., 1980. *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*. Second Edpenyunt. s.l.:Baltimore: Williams
- Madigan, Michael T., David, P., Clarck, David S., John, M. Martinko. 2011. *Brock Microbiology of microorganisms*. San Francisco: Benjamin Cummings publishing.
- Manalu RT, Bahri S, Melisa M, dan Sarah S, 2020. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Asal Feses Manusia Sebagai Antibakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Sainstech Farma Jurnal Ilmu Kefarmasian*. 1
- Mc Kane. L., Kandel. 1985. *Microbiology: Essencial and Aplication*. Mc Graw Hill Book Company. New York.
- Maleki, D., Azizi, A., Veghef. E., Balkani, S., Homayouni, A. 2015. Methods of Increasing Probiotic Survival in Food and Gastrointestinal Conditions. *La Prensa Medica Argentina*. Vol 101 (4): 2-9.
- Manopo, H., Reiny, A. T., Hengky, J., I. A. Novitarizky. 2019. The use of probiotic isolated from Sangkuriang cat fish (*Clarias garipinus* var. Sangkuriang) intestine to improve growth and feed efficiency of carp, *Cyprinus carpio*. *Journal AACL Bioflux*. Vol 12 (1): 239
- Marteu, P., Seksis, P. Jian, R. 2002. Probiotics and intestinal health effect: a clinical perspective. *British Journal of Nutrition*. Vol 88 (1): 51-57.
- Martinez, F.A.C., Eduro, M.B., Attilio, C., Paul. D.C., Ricardo, P.S.O. 2013. Bacteriocin Produced By *Bifidobacterium* Spp. A Review. *Biotechnology Advances*. 31. pp. 482-488.

- Maruka, S. S., Siswohutomo., dan G. R. Rahmatu. 2017. Identifikasi cemaran bakteri *Escherichia coli* pada ikan layang segar diberbagai pasar. *Jurnal Mitra Sains*. Vol 5 (1):84-89.
- M. Falakh., Mahanani T. A. 2022. Uji Potensi Isolat Bakteri Asam Laktat dari Nira Siwalan (*Borassus flabellifer* L.) sebagai Antimikroba terhadap *Salmonella typhi*. *LenteraBio*. Vol 11 (3): 514-524
- Montgomery, D. C. 2011. *Design and Analysis of Experiments 7th edition*. New York: Jhon Wiley & Sons.
- Murhananto. 2002. *Pembesaran Lele Dumbo di Pekarangan*. PT Agromedia Pustaka. Tangerang
- Murphy P. 2000. *Hanbook Of Hydrocolloids*. Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC. New York
- Nafis, M., Zainuddin dan Masyhita.2017. Gambaran Histologi Saluran Pencernaan Ikan Gabus (*Channa striata*). *Jimvet*. Vol 01 (2): 196 -202.
- Naiola, E. dan Widhyastuti, N., 2002, Isolasi, Seleksi dan Optimasi Produksi Protease Dari Beberapa Isolat Bakteri. *Berita Biologi*. 6 (3).
- Nycahas, G. J. E. and C. C. Tassou. 2000. *Traditional Preservatives oil and Spices*. Encyclopedia of Food Microbiology. London. Academic Press.
- Orla jensen. 1924. *Bifidobacterium*. Int. J. Syst. Bacteriol. 30:264
- Ostertagova, E., Ostertag, O., and Kovac, J. 2014. Methodolgy and application of the Kruskal-Wallis test. *In Applied Mechanics and Materials*. Vol 611 (115-120).
- Ouwehand, A. C. 1998. *Antimicrobial Component from Lactid Acid Bacteria*. In: Salminen and A. Von Wright (Eds) *Lactid Acid Bacteria*. Marcel Decker Inc. New York.
- Pakpahan, R., 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik Dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara. *Skripsi*. Sumatera Utara.
- Pelczar, Michael J., dan Chan, E. C. S., 1986, 190-191, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Universitas Indonesia, UI-Press, Jakarta.
- Pelezar, M. J. dan Chan, E. C. S. 1998. *Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid II* diterjemahkan oleh Hadioetomo, R. S. Penerbit Universitas Indonesia. UI Press. Jakarta.
- Pelezar, M. J. dan Chan, E. C. S. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid I*. UI Press. Jakarta.
- Pradan, P., 2014. Voges Proskauer Test (VP Test): Principle, Procedure, Interpretation And Quality Control. [Online] Available at: <https://microbeinfo.com> [Diakses 20 Oktober 2022].

- Pratiwi, R. 2008. Perbedaan Daya Hambat terhadap *Streptococcus mutans* dari Beberapa Pasta Gigi yang mengandung Herbal. *Kedokteran gigi*. Vol 38 (2): 64-67.
- Prayoga IPA, Ramona Y, dan Suaskara IBM, 2021. Bakteri Asam Laktat Bermanfaat dalam Kefir dan Perannyamdalam Meningkatkan Kesehatan Saluran Pencernaan. *Simbiosis*. 9(2): 115-130.
- Putri, W. D., Haryadi., D. W. Marseno., M.N. Cahyanto. 2012. Isolasi Bakteri Asam Laktat Amilolitik Selama Fermentasi Growol Makanan Tradisional Indonesia. *Jurnal Teknologi Pertanian*. Vol 13 (1): 52-60.
- Quiresa. M.C.M., S. F. Poblete., Olympia. G., Anjelo. G., Jessry., Melandro. C., Dennis. K. 2022. Isolation of *Lactobacillus* sp in African Catfish *Clarias gariepinus* as a probable probiotics in aquaculture. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. Vol 10 (1): 125-129.
- Quraish. S. 2002. *Tafsir Al-Misbah: Pesan, Kesan, Keserasian Al-Qur'an, Jilid 2*. Lentera Hati. Jakarta
- Rahardjo, M. F., dan Muniarti. 1984. *Anatomi Beberapa Jenis Ikan Ekonomis Penting di Indonesia*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. IPB Press
- Raharjo, T. J. 2012. *Kimia Hasil Alam*. Yogyakarta: Pustaka Belaja.
- Rahayu, K. 1990. *Teknologi Enzim*. Penerbit Pusat Antar Universtas Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Ratna, S., 2012. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Ray. B. 2001. *Fundamental food microbiology*. Ed-2 New York: CRC Press.
- Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A. 2004. *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*.
- Sanin. H. 1984. *Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan*. Bina Cipta. Jakarta.
- Sari R & Apridamayanti P, 2014, Cemaran Bakteri Eschericia coli Dalam Beberapa Makanan Laut yang Beredar di Pasar Tradisional Kota Pontianak. *Artikel Jurnal Ilmiah Farmasi*. 2 (2): 14-19
- Scardovi, V. 1981. *The Genus Bifidobacterium. In Begey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2 (1418).Springer. New York.
- Seerengaraj, V., Kannan, S., and S. Muthukumar. 2016. Isolation and characterization of probiotic bacteria isolated from diverse fish fauna of the trodden Vaigai river at Theni District. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. Vol 8 (7): 883-889.
- Sekirov, I., and B. B. Finaly. 2009. The Role of The Intestinal Microbiota in Enteric Infection. *Journal Physiol*. 587: 4159-4167.

- Shobikhuliatul. J. J., S. Imelda. 2018. Histopatologi Insang, Hati dan Usus Ikn Lele di Kota Kupang, Nusa Tenggara Timur. *Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*. Vol 14 (1): 23-29.
- Short, S., A.C, Ouwehand, and S.Salminen. 1999. Probiotics : mechanism and established effects. *International Dairy Journal*. Vol 9 : 43-52.
- Simadabrta, M. 2010. *Probiotik-Perannya Dalam Dunia Medis*. Universitas Indonesia. Jakarta
- Stamer, J.R. 1979. The Lactid Acid Bacteria: Microbe of Diversity. *Food Technology*. 33 (1): 60-65.
- Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., lynch, P.B and Rose, R. 2001. Market potensial for probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol 73: 476-483.
- Subagiyo, A. Junaedi. 2010. *Desain dan Konstruksi Konsorsium Probiotik sebagai Strategi Penyehatan pada Budidaya Benih Ikan Kerapu*. Lembaga Penelitian Universitas Diponegoro.
- Sulistyo. 1971. *Farmakologi dan Terapi*. EKG. Yogyakarta.
- Sumarsih. S., Sulistyanto., C.I. Sutrisno., E.S. Rahayu. 2012. Peran Probiotik Terhadap Produktivitas Unggas. *Jurnal Litbang Jawa Tengah*. Vol 10 (1).
- Surono, I.S. 2004. *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Tri Cipta Karya. Jakarta.
- Suwarsih. 2011. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. *Prospektus*. vol ix (1) : 48-55.
- Suyanto. S. R. 2006. *Budidaya Ikan Lele (revisi)*. Penebar Swadya. Jakarta.
- Syulasmu, A., Y. Hamdiyati Dan Kusnadi. 2005. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi*. Fakultas MIPA. Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.
- Tankeshwar. 2014. *Methyl Red (MR) Test Principle, Procedure and Result Interpretation*. [Online] Availableat: <https://microbeonline.com> [Diakses pada 20 Oktober 2022].
- Tambunan, A. R. 2016. Karakteristik Probiotik Berbagai Jenis Bakteri Asam Laktat (BAL) Pada Minuman Fermentasi Laktat Sari Buah Nanas. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Tille, P. M. 2017. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. In *Basic Medical Microbiology (Fourteenth, p45)*. St. Louis Missouri: Elsevier
- Verschuere, L. G. Rombaut., P. Sorgeloos., dan W. Verstraete. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Jurnal Microbiol Mol Biol Rev*. Vol 64 (4): 655-671.

- Vine, N.G., W.D. Leukes, H. Kaiser, S. Daya, J. Baxter & T. Hecht. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J. FishDis.*27:319–326.
- Wardani, B. A., R. Sari., Sarjito. 2013. Inventarisasi Bakteri Yang Berpotensi Sebagai Probiotik Dari Usus Ikan Bandeng (Chanos Chanos). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. Vol 2 (1): 75-86.
- Watson, K. A. Kapsar, H. Lategan, M. J., dan Gibson, L. 2008. Probiotics in Aquaculture: The need, Principles and mechanisms of action and Screening processes. *Aquaculture*. Vol 274 (1): 1-14.
- Whitman, K. A. and MacNir, N.G., 2010. *Finfish and Shellfish Bacteriology Manual: Techniques and Procedures*. Ames. Iowa State University Press. <http://www.iowastatepress.com> (online). diakses 20 Januari 2022.
- Winarno, FG. 1993. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia. Jakarta.
- Winarno, FG. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Winiati, P. R., Nurjanah, S., dan E. Komlasari. 2018. *Patogenitas, Analisis, dan Kajian Risiko Escherichia coli*. IPB PRESS. Bogor.
- Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, Sasaki T, Amano J, Kano Y, Taniguchis. 2000. Bifidobacterium longum as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 66: 165-170.
- Yousef, A. E. and C. Clastrom. 2003. *Food Microbiology (A Laboratory Manual)*. Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Inc. Ohio State University. USA. 223-224.
- Yuliana, Neti. 2009. Viabilitas Inokulum Bakteri Asam Laktat ((BAL) yang dikeringkan secara Kimoreksi dengan Kalsium Oksida dan Aplikasinya pada Tempoyak. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. Vol 14. (1)
- Yunita, M., Y. Hendrawan, dan R. Yulianingsih. 2015. Analisis Kuantitatif Mikrobiologi Pada Makanan Penerbangan (*Aerofood ACS*) Garuda Indonesia Berdasarkan TPC (Total Plate Count) Dengan Metode Pour Plate. *Jurnal Keteknikaan Pertanian Tropis dan Biosistem*. Vol 3 (3): 239
- Yusuf, R. W. 2009. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Gram Negatif pada Luka Ikan Maskoki (Carassius auratus) akibat Infeksi Ektoparasit Argulus sp.* Universitas Airlangga. Surabaya.
- Yuwono. 2011. Methicilin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): Ancaman Serius pada Penatalaksanaan Pasien Infeksi. *Jurnal Syifa Medika*. vol 1 (2):117.