

Identifikasi Awal Bakteri Kandidat Probiotik Asal Usus ikan Nila dengan Metode Uji Gram Menggunakan KOH 3%

(Initial Identification of Bacterial probiotic Candidate From Tilapia Intestine Using Gram Method With 3% KOH)

Lukman Anugrah Agung^{1*}, Dodi Hermawan¹, Muh. Herjayanto¹

¹ Program Studi Ilmu Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Sultan Ageng tirtayasa

*Penulis korespondensi: lukman.anugrah@untirta.ac.id

Informasi Naskah:

Diterima: Maret 2024

Direvisi: Mei 2024

Disetujui: Mei 2024

Keywords:

Gram Identification

KOH 3%

Probiotic

ABSTRACT

Probiotic bacteria are beneficial microbes that have potential to promote fish growth and immunity. These beneficial bacteria can be isolated from the intestines of fish. Although Gram staining has been used for initial bacterial identification as probiotic candidates, that method was time-consuming, so the development of more efficient methods was needed. This study aims to investigate the effectiveness of the KOH 3% test as an alternative method for preliminary Gram identification of bacteria isolated from the intestines of Nile tilapia to identify potential probiotic candidates. The KOH 3% test method was a drop of 3% KOH solution to bacterial colonies fixed on a microscope slide. This solution influences the bacterial cell wall. In gram-positive bacteria, the thick cell wall remains unaffected by KOH, resulting in no visible change. However, in gram-negative bacteria, the thinner cell wall is susceptible to KOH 3% degradation, forming the formation of filaments or slimy threads. The result showed that among one from seven bacterial isolates obtained, of six colonies were identified as gram-positive bacteria, while one colony was classified as gram-negative. The use of KOH 3% test for Gram identification of bacteria proved significantly faster, requiring only 30-60 seconds. This rapid method demonstrates the potential of KOH 3% Gram identification as an efficient tool for preliminary screening of probiotic bacterial candidates from Nile tilapia intestines

ABSTRAK

Bakteri probiotik adalah bakteri potensial yang dapat meningkatkan pertumbuhan serta imunitas ikan. Salah satu metode yang dilakukan untuk uji identifikasi awal pada bakteri sebagai kandidat probiotik adalah dengan uji pewarnaan gram. Namun, uji pewarnaan gram membutuhkan waktu yang lama sehingga perlu dilakukan metode uji yang lebih efektif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penggunaan metode uji KOH 3% dalam pengujian gram bakteri untuk uji identifikasi awal bakteri asal usus ikan nila sebagai kandidat probiotik pada ikan. Metode yang digunakan yaitu meneteskan KOH 3% pada koloni bakteri yang difiksasi pada kaca preparat. Tetesan KOH akan bereaksi dengan dinding sel bakteri. Pada bakteri gram positif, dinding sel yang tebal dan kaku tidak terpengaruh oleh KOH, sehingga tidak terjadi perubahan. Namun, pada bakteri gram negatif, dinding selnya lebih tipis dan mudah terurai oleh KOH sehingga menghasilkan filamen atau benang berlendir. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 7 isolat bakteri yang dihasilkan, 6 bakteri merupakan bakteri gram positif dan 1 bakteri merupakan bakteri gram negatif. Hasil pengujian gram bakteri dengan uji KOH 3% membutuhkan waktu yang lebih cepat yaitu 30-60 detik sehingga uji gram bakteri dengan KOH 3% dapat diaplikasikan sebagai salah satu metode identifikasi awal bakteri kandidat probiotik asal usus ikan nila.

Kata kunci:

KOH 3%

Pewarnaan Gram

Probiotik

Pendahuluan

Saluran pencernaan ikan menjadi tempat hidup komunitas mikroorganisme yang secara normal hidup, berkembang, dan berinteraksi dengan ikan sebagai inangnya. Mikroorganisme dapat ditemukan di semua bagian saluran pencernaan, meliputi rongga mulut, esophagus, lambung, *pyloric caeca*, usus bagian awal, usus bagian tengah, dan usus bagian akhir (Talwar *et al.*, 2018).

Komunitas mikroorganisme dalam usus ikan tersebut dapat membantu berbagai fungsi tubuh ikan, seperti perkembangan saluran pencernaan, proses pencernaan makanan, penyerapan nutrisi, dan bahkan daya tahan tubuh terhadap penyakit (Romero *et al.*, 2014). Sistem pencernaan ikan lebih sederhana dibandingkan hewan darat, sehingga kemampuan mencerna dan menyerap nutrisi pada ikan menjadi terbatas. Akibatnya, pakan buatan dengan nutrisi yang tinggi seringkali tidak bisa dimanfaatkan seluruhnya oleh ikan. Nutrisi seperti protein, lemak, dan karbohidrat yang tidak tercerna ini akan disekresikan oleh ikan dalam kondisi nutrisi yang masih tinggi sehingga dapat menyebabkan pencemaran perairan akibat tingginya kadar amoniak.

Salah satu alternatif pemecahan masalah tersebut adalah dengan meningkatkan ketersediaan enzim pencernaan eksogen dengan memanfaatkan bakteri yang dapat berperan sebagai probiotik. Menurut Wardika *et al.* (2014), probiotik dapat meningkatkan kesehatan dan pertumbuhan ikan dengan beberapa cara diantaranya yaitu dengan membantu mengatur lingkungan usus sehingga dapat menjaga keseimbangan mikroflora dalam usus sehingga menurunkan bakteri patogen dalam usus ikan. Selain itu, probiotik melepaskan enzim yang membantu pencernaan ikan sehingga, memungkinkan ikan dapat memanfaatkan nutrisi dari makanannya dengan efisien. Nayak (2010) menyatakan bahwa dosis probiotik umumnya bervariasi dari $10^6 - 10^{10}$ CFU/g pakan, dengan dosis optimum probiotik dapat bervariasi tergantung dari jenis inang dan tingkat kekebalan tubuhnya.

Kajian mengenai potensi berbagai mikroorganisme yang ditemukan di usus ikan nila sebagai kandidat probiotik seringkali dilakukan oleh para peneliti di bidang akuakultur. Namun, mengidentifikasi bakteri probiotik di antara banyaknya komunitas mikroba dalam usus ikan terbukti menjadi tantangan. Banyaknya mikroorganisme membuat sulit untuk menentukan bakteri dominan dan dapat berdampak positif pada pertumbuhan ikan. Oleh karena itu metode yang dapat dilakukan untuk mengetahui jenis bakteri yang terkandung yakni melakukan identifikasi mikroorganisme dengan perlakuan uji biokimia.

Rahayu dan Gumilar (2017) mengemukakan bahwa pengujian biokimia bakteri merupakan metode penting untuk mengidentifikasi dan mengisolasi strain bakteri tertentu melalui sifat-sifat fisiologisnya. Metode ini menganalisis sifat fisiologis serta proses biokimia bakteri, diantaranya proses yang terlibat dalam produksi energi dan aktivitas seluler (termasuk pergerakan). Pewarnaan gram merupakan uji biokimia tahap awal untuk seleksi bakteri probiotik potensial. Namun pewarnaan gram memiliki kelemahan yaitu prosedur pewarnaan gram membutuhkan beberapa tahap pengujian sehingga membutuhkan waktu lebih lama. Selain itu interpretasi hasil pewarnaan gram lebih subjektif, sehingga dapat menyebabkan ketidakkonsistenan dan mispersepsi hasil pengamatan (Lyu *et al.* 2016).

Salah satu metode yang dapat digunakan dalam uji gram bakteri yaitu dengan KOH 3%. Metode gram dengan pengujian KOH 3% merupakan Penentuan sifat gram dengan KOH 3% memiliki hasil yang sama dengan pengujian pewarnaan gram. Pengujian KOH 3% pada bakteri mengindikasikan bakteri gram (+) memiliki dinding sel yang tebal dan lemak yang tipis sedangkan gram (-) berlemak tebal dan berdinding sel tipis yang berada di ruang periplasma. KOH akan bereaksi dengan lemak (*bilayer lipid*) dan membuat sel gram (-) pecah. Sel yang pecah akan melepaskan materi genetik (DNA) yang merupakan

substansi melimpah di dalam sel bakteri. Molekul DNA sangat panjang dan lengket yang memberikan hasil seperti lendir saat diangkat dengan jarum ose (Edwin, 2011). Sedangkan pada gram (+) tidak terdapat lendir setelah disuspensikan dengan KOH karena dinding sel bakteri gram (+) lebih tebal sehingga tidak terjadi kerusakan dinding sel bakteri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penggunaan metode uji gram dengan KOH 3% dalam mengidentifikasi bakteri kandidat probiotik dari usus ikan nila. Hal ini merupakan langkah awal dalam upaya seleksi probiotik untuk menghasilkan bakteri probiotik potensial dalam akuakultur. Informasi dari hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi solusi bagi para peneliti atau akademisi dalam melakukan tahapan proses identifikasi terhadap berbagai mikroorganisme kandidat probiotik dari saluran pencernaan ikan.

Metode Penelitian

Pembuatan Media Tumbuh

Mikroorganisme

Pembuatan media tumbuh mikroorganisme dengan menggunakan media TSA. Pembuatan media TSA dilakukan dengan menggunakan 6 gram nutrient broth dan mL aquades steril kemudian dilakukan sterilisasi basah menggunakan autoclave.

Pengumpulan Data

Prosedur Isolasi Bakteri Probiotik

Sampel ikan Nila yang diambil berasal dari kolam budidaya di Balai Benih Ikan Baros, Kabupaten Serang. Pada pengambilan sampel, ikan nila di ambil sebanyak 3 ekor dengan panjang rata-rata 16 cm dan bobot rata-rata 43,8 gram kemudian dibedah. Selanjutnya, saluran pencernaan diambil.

Prosedur isolasi bakteri yaitu pertama usus sampel dimasukan ke dalam *microtube* dan ditimbang beratnya. Usus ikan yang digunakan berasal dari semua bagian usus. Berat usus ikan yang digunakan yaitu 1 g. Kemudian dihaluskan dengan *pellet pestle*, dan ditambahkan sebanyak 9 mL NaCl 0,9%

steril, lalu dihomogenkan menggunakan vortex.

Selanjutnya, dilakukan penggoresan bakteri pada media kultur dengan mengambil jarum ose kemudian dilakukan sterilisasi pemijaran pada bunsen kemudian dicelupkan pada suspensi usus ikan dalam microtube dan dilakukan penggoresan secara zig-zag di atas permukaan media NA dalam cawan petri. Setelah isolasi bakteri dilakukan kemudian dilakukan pengecekan dan pengamatan fisik pertumbuhan bakteri setiap harinya.

Pengujian dengan KOH 3%

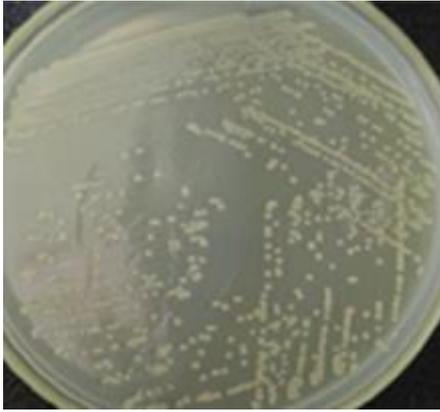
Pengujian dengan KOH 3% bertujuan mengetahui jenis gram bakteri. Metode pengujian dengan KOH 3% yaitu melalui pencampuran isolat bakteri dengan KOH 3% pada kaca preparat steril. Metode identifikasi bakteri dilakukan dengan meneteskan 1 tetes KOH 3% di atas kaca preparat kemudian bakteri yang telah tumbuh jarum ose dan disuspensikan pada larutan KOH 3% dan dilakukan pengamatan. Tes dianggap positif jika lendir terlihat dalam 30 detik pertama setelah pencampuran dalam larutan KOH 3% (bakteri gram negatif) (Jaya *et al.*, 2011).

Hasil pengamatan koloni bakteri serta hasil uji gram dengan KOH 3% tersaji pada tabel 1.

Tabel 1.

Hasil pengamatan koloni bakteri dan uji gram dengan KOH 3%

Kode Bakteri	Tipe koloni	Warna	Bentuk koloni	Pewarnaan gram	KOH 3%
MA1	Round	Krem	kokus	+	-
MA2	Round	putih	kokus	+	-
MA3	Round	oranye	kokus	+	-
MA4	Oval	Putih susu	Rod	+	-
MA5	Round	Kuning	Rod	+	-
MA6	Oval	Kuning	Kokus	+	-
MA7	Oval melebar	Putih	Kokus	-	-



Gambar 2. Hasil isolasi bakteri dari usus ikan nila



Gambar 3. Hasil uji KOH 3% pada isolat bakteri gram positif (tidak ada lendir saat diangkat)

Pembahasan

Hasil uji reaksi gram (Tabel 1) menunjukkan bahwa 6 koloni bakteri hasil isolasi dari usus ikan nila tidak menghasilkan lendir saat pengujian reaksi gram dengan menggunakan KOH 3% (hasil -), dan 1 koloni menghasilkan lendir (hasil +) yang berarti bahwa 6 koloni merupakan bakteri gram positif sedangkan 1 koloni merupakan bakteri gram negatif.

Adanya lendir menunjukkan bahwa bakteri merupakan gram negatif. Hal ini karena larutan alkali kuat (3% KOH) memecah dinding sel bakteri ini, melepaskan zat yang membentuk lendir. Sebaliknya, bakteri gram positif memiliki dinding sel yang dapat menahan larutan alkali ini, sehingga tidak ada lendir yang dihasilkan. Hal ini sesuai dengan pendapat Soekirno (2008) tentang penggunaan KOH 3% untuk mengidentifikasi bakteri gram positif dan gram negatif. Metode ini melibatkan pencampuran sampel bakteri yang diambil dengan menggunakan jarum ose dengan KOH 3% pada slide. Jika pada saat ose diangkat

tampak benang lendir, maka bakteri tersebut adalah gram negatif, namun jika dihasilkan suspensi berair dan tidak tampak adanya benang lendir setelah ose digerakkan berulang maka kultur bakteri itu adalah gram positif.

Dalam upaya isolasi bakteri sebagai kandidat probiotik, metode pewarnaan gram membantu identifikasi awal organisme untuk dapat dilanjutkan dengan metode yang lebih spesifik seperti uji kemampuan bakteri probiotik dalam menghasilkan enzim yang berguna dalam membentuk pencernaan ikan serta kemampuan bakteri dalam meningkatkan imunitas ikan. Metode identifikasi gram bakteri dengan KOH 3% memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan metode pewarnaan gram bakteri karena kecepatan pengujian akan lebih cepat dan biaya yang diperlukan akan lebih murah.

Pada penelitian ini, bakteri MA 4 diduga merupakan bakteri kandidat probiotik. Bakteri ini tidak menunjukkan adanya lendir ketika disuspensikan dengan KOH 3% (gram positif), bentuk koloni rod, serta warna koloni putih susu. Bakteri tersebut diduga merupakan bakteri jenis bacillus. Hasil ini sesuai dengan penelitian Lestari *et al* (2016) yang menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus* yang ditemukan pada saluran pencernaan sidat memiliki bentuk oval, warna putih susu, gram positif serta berbentuk batang (rod). Bakteri ini dapat diaplikasikan pada ikan karena memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim pencernaan seperti amilase, lipase dan tripsin sehingga membantu meningkatkan aktivitas pencernaan ikan serta mampu meningkatkan aktivitas fagositik sehingga dapat meningkatkan sistem imun ikan.

Kesimpulan

Penggunaan metode uji gram KOH 3% menghasilkan hasil yang sama dengan penggunaan uji pewarnaan gram, selain itu penggunaan KOH 3% membutuhkan tahapan uji yang lebih sederhana serta lebih cepat sehingga cocok digunakan sebagai metode

identifikasi awal seleksi bakteri kandidat probiotik pada ikan.

Daftar Pustaka

- Edwin. 2011. Materi Kuliah Mikrobiologi. Banjarbaru (ID): Universitas Lambung Mangkurat.
- Musdyaningwati T. 2016. Tingkat Korelasi Pengetahuan Dengan Sikap Keputusan Membeli Makanan Halal pada Mahasiswa Universitas Muhammadiyah Semarang. [Skripsi]. Semarang:Universitas Muhammadiyah
- Jaya CT. & Subha MP. 2011. A Study of 2 Rapid Tests to Differentiate Gram Positive and Gram Negative Aerobic Bacteria. *J. Med Allied Sci*; 1(2): 84-85.
- Lestari, N. W., & Budiharjo, A. (2016). Bakteri heterotrof aerobik asal saluran pencernaan ikan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) dan potensinya sebagai probiotik. *Bioteknologi*, 13 (1), 9–17. <https://doi.org/10.13057/biotek/c130102>.
- Lyu, X., Zhao, C., Yan, Z. M., & Hua, H. (2016). Accuracy of three methods for the rapid diagnosis of oral candidiasis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 51, 610–615.
- Nayak SK. 2010. Probiotics and Immunity: A Fish Perspective. Review. *Fish and Shellfish Immunology*. 29:2- 14
- Rahayu SA, Gumilar MH. 2017. Uji Cemanan Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung Dengan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi Indonesia*. 4 (2): 50-56
- Romero, J., E. Ringø & D.L. Merrifield. 2014. The gut microbiota of fish. *Aquac. Nutr.*, Wiley Online Books. doi:<https://doi.org/10.1002/9781118897263.ch4>
- Soekirno, 2008. Pedoman Pengelolaan Koleksi dan Identifikasi OPT (khusus untuk patogen penyakit tanaman) pada Tanaman Hortikultura. Jakarta (ID): Direktorat Perlindungan Tanaman Hortikultura.
- Wardika, A. S., Suminto, Agung S. 2014. Pengaruh Bakteri Probiotik pada Pakan Ikan Dengan Dosis Berbeda terhadap Efisiensi Pemanfaatan Pakan, Pertumbuhan dan Kelulusan Hidup Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*.3; 9-17
- Talwar, C., S. Nagar, R. Lal & R.K. Negi. 2018. Fish gut microbiome: current approaches and future perspectives. *Indian J. Microbiol.* 58: 397-414. doi:10.1007/s12088-018-0760-y.