PENGARUH PENAMBAHAN KONSENTRASI GARAM BERBEDA TERHADAP PROFIL ASAM LEMAK DAGING IKAN LELE (*Clarias* sp.) YANG TERINFEKSI *Aeromonas hydrophila* SECARA ARTIFISIAL

SKRIPSI

Oleh:

NIA KAROMATUL AULIA
NIM. 155080300111030

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG

2019

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

PENGARUH PENAMBAHAN KONSENTRASI GARAM BERBEDA TERHADAP PROFIL ASAM LEMAK DAGING IKAN LELE (*Clarias* sp.) YANG TERINFEKSI *Aeromonas hydrophila* SECARA ARTIFISIAL

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar
Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya

Oleh:

NIA KAROMATUL AULIA
NIM. 155080300111030

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
Mei, 2019

PENGARUH PENAMBAHAN KONSENTRASI GARAM BERBEDA TERHADAP PROFIL ASAM LEMAK DAGING IKAN LELE (*Clarias* sp.) YANG TERINFEKSI *Aeromonas hydrophila* SECARA ARTIFISIAL

Oleh:

NIA KAROMATUL AULIA
NIM. 155080300111030

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 20 Juni 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. M. Firdaus, MP)
NIP. 19680919 200501 1 001
Tanggal : 04 JUL 2019

Menyetujui,
Dosen Pembimbing

(Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, M.Si.)
NIP. 19640726 198903 2 004
Tanggal : 04 JUL 2019

IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : **PENGARUH PENAMBAHAN KONSENTRASI GARAM BERBEDA TERHADAP PROFIL ASAM LEMAK DAGING IKAN LELE (*Clarias* sp.) YANG TERINFEKSI *Aeromonas hydrophila* SECARA ARTIFISIAL**

Nama Mahasiswa : NIA KAROMATUL AULIA
NIM : 155080300111030
Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan

PENGUJI PEMBIMBING :
Pembimbing : Dr. Ir. HARTATI KARTIKANINGSIH, M.Si.

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING :
Dosen Penguji 1 : Dr. Sc. Asep Awaludin P., S.Pi., MP.
Dosen Penguji 2 : Abdul Aziz Jaziri, S.Pi., M.Sc.

Tanggal Ujian : 20 Juni 2019

repository.ub.ac.id

PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nia Karomatul Aulia

NIM : 155080300111030

Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang saya tulis ini adalah benar hasil karya saya sendiri dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali tertulis dalam literatur yang terdaftar dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut sesuai dengan hukum yang berlaku.

Malang, 1 April 2019
Mahasiswa,

Nia Karomatul Aulia

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, puja dan puji syukur saya panjatkan kehadirat Allah SWT, Tuhan Yang Maha Esa, karena rahmat dan karuniaNya saya dapat menyelesaikan laporan skripsi ini. Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada:

1. Bapak dan Ibu tercinta, serta adik-adikku: Aisyah Aulia, Rio Farhan Aulia, dan Dinda Tsaqib Aulia yang selalu memberikan doa dan dukungan selama penyusunan laporan skripsi ini.
2. Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, M.Si. selaku Dosen Pembimbing, yang telah memberikan arahan dan bimbingan selama penyusunan sampai dengan selesainya laporan skripsi ini.
3. Pak Udin, Mba Mega, dan Mba Henny yang telah memberikan ruang dan waktu untuk berbagi ilmu kepada kami.
4. Keluarga besar bimbingan Bu Hartati: Chusnul, Kurnia, Dian Wahyu, Radik, Jasmine, Wirda, Fahmi, Awal, Mulki, Dewi Endah, dan Widya yang telah saling menguatkan dalam setiap langkah.
5. Teman-teman Watugong 17B: Nur Ainun, Siti Julaikha, Millnia, Sofi, Aulia, Angella, dan Ainin yang telah saya anggap sebagai saudara di tanah rantau.
6. Kawan seperjuangan perasistenan praktikum: Winda Firdayanti, Nada Itorul, Govinda Arsagriestian, Aliya Cita, Nessa Septianingsih, dan Rendhy Aditya yang telah saling menginspirasi dalam setiap langkah.
7. Teman-teman keluarga besar Ekspedisi Nusantara Jaya (ENJ) 2017 dan Ekspedisi Perintis Maritim (EPM) 2018: Bang Anggit, Mba Titik, Kak Fajriyan, Danny, Mba Wulan, Nessa, Isna, Agatha, Mba Inessa, Astuti, Hafidz, Bayezid, Irfan, Diki, Kak Syafiq, Plato, Winda, Mba Yuni, Dita, Wiwin, Fairus, Krisma, dan Yoan yang telah memberikan arti perjuangan yang sesungguhnya.

8. Kawan-kawan sejak maba: Husna Wafiyah, Intan Resza Dela, Kartika Dyah Aninta, Linda Mardiyana Muslimah, Novrealita Maghfira Setiyana, dan Mba Rahma Purvidyasari yang telah sama-sama berproses hingga mencapai titik ini.
9. Saudara-saudara, sahabat-sahabat, teman-temanku yang membantu, menemani dan memberikan dorongan sehingga laporan ini bisa terselesaikan.

Malang,

Penulis

repository.ub.ac.id

RINGKASAN

NIA KAROMATUL AULIA (155080300111030). Pengaruh Penambahan Konsentrasi Garam Berbeda Terhadap Profil Asam Lemak Daging Ikan Lele (*Clarias* sp.) yang Terinfeksi *Aeromonas hydrophila* Secara Artifisial. (di bawah bimbingan **Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, M.Si.**)

Ikan lele merupakan komoditas ikan air tawar yang digemari masyarakat. Selain harganya murah dan budidaya yang mudah, ikan lele menawarkan kandungan gizi yang cukup lengkap. Kandungan gizi tersebut salah satunya ialah EPA dan DHA yang merupakan asam lemak esensial penting bagi tubuh karena tidak diproduksi oleh tubuh. Dibalik pentingnya kandungan gizi asam lemak tersebut, ikan lele sangat rentan terhadap penyakit MAS (*Motile Aeromonad Septicemia*) akibat serangan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Infeksi *Aeromonas hydrophila* sering menyebabkan kerusakan jaringan daging akibat eksotoksin dan endotoksin yang diproduksi oleh bakteri. Bakteri *Aeromonas hydrophila* juga memproduksi enzim lipase yang dapat merombak susunan lemak menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga menyebabkan kerusakan lemak. Salah satu usaha mencegah aktivitas bakteri ialah dengan metode penggaraman sebelum diolah.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil asam lemak daging ikan lele (*Clarias* sp.) yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila.* Sebagai pendukung, dilakukan uji TPC, kadar garam, kadar lemak, dan angka peroksida. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember sampai dengan April 2019 di Laboratorium Ilmu Teknologi Hasil Perikanan Divisi Keamanan Hasil Perikanan dan Divisi Perekayasaan Hasil Perikanan, Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Parasit dan Penyakit ikan dan Divisi Reproduksi Ikan, Laboratorium Hidrobiologi Divisi Sumberdaya Ikan, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Gizi, Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Airlangga.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan variabel bebas konsentrasi garam dan variabel terikat profil asam lemak. Uji profil asam lemak dilakukan menggunakan instrumen GC-MS (*Gass Chromatography-Mass Spectrometry*).

Berdasarkan hasil penelitian, profil asam lemak didominasi oleh asam lemak kaprat (C:10:0), stearat (C18:0), miristat (C14:0), linoleat (C18:2n6), vaksenat (C18:1n7), dan lignoserat (C24:0). Terdapat pengaruh beda nyata antara perbedaan konsentrasi garam yang digunakan baik dengan infeksi maupun tanpa infeksi *Aeromonas hydrophila* terhadap profil asam lemak daging ikan lele (*Clarias* sp.). Secara keseluruhan, jumlah *peak* yang terdeteksi turun seiring penambahan konsentrasi garam dan juga akibat pengaruh infeksi *Aeromonas hydrophila*, khususnya pada jenis asam lemak tidak jenuh tunggal (MUFA) dan asam lemak tidak jenuh ganda (PUFA).

Disarankan untuk dilakukan pengolahan lebih lanjut menggunakan media panas serta dilakukan pengujian konsentrasi garam terbaik yang mampu mempertahankan asam lemak daging ikan lele (*Clarias* sp.).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, yang atas rahmat-Nya jugalah penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini. Dalam penyusunan laporan ini, tidak sedikit hambatan yang kami hadapi. Namun kami menyadari bahwa kelancaran dalam penyusunan tugas ini tidak lain berkat bantuan, dorongan, dan bimbingan dari pembimbing serta kerja sama, sehingga kendala-kendala yang kami hadapi dapat teratasi.

Di dalam tulisan ini disajikan beberapa bahasan yang meliputi penjelasan mengenai penginfeksian ikan lele, perlakuan garam, pengujian biokimia dan uji kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila*, serta mengetahui pengaruh perlakuan penambahan konsentrasi garam terhadap profil asam lemak ikan lele yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila*.

Semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat dan menjadi sumbangan pemikiran bagi pihak yang membutuhkan, khususnya bagi penulis sehingga tujuan yang diharapkan dapat tercapai. Aamiin.

Malang, 1 April 2019

Penulis

repository.ub.ac.id

DAFTAR ISI

Halaman

RINGKASAN ..... **viii**
KATA PENGANTAR ..... **ix**
DAFTAR ISI ..... **x**
DAFTAR TABEL ..... **xii**
DAFTAR GAMBAR ..... **xiii**
DAFTAR LAMPIRAN ..... **xiv**

1. PENDAHULUAN **1**
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Perumusan Masalah 3
1.3 Tujuan 3
1.4 Hipotesis 3
1.5 Kegunaan 4
1.6 Tempat dan Waktu 4

2. TINJAUAN PUSTAKA **5**
2.1 Ikan Lele (*Clarias* sp.) 5
2.2 *Aeromonas hydrophila* 7
2.2.1 Deskripsi dan Klasifikasi *Aeromonas hydrophila* 7
2.2.2 Morfologi *Aeromonas hydrophila* 8
2.2.3 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan *Aeromonas hydrophila* 8
2.2.4 Patogenitas *Aeromonas hydrophila* 9
2.3 Lemak dan Minyak 12
2.3.1 Pengertian Lemak dan Minyak 12
2.3.2 Lemak Ikan 13
2.3.3 Minyak Ikan 14
2.4 Asam Lemak 14
2.4.1 Asam Lemak Jenuh 15
2.4.2 Asam Lemak Tidak Jenuh 15
2.4.3 Profil Asam Lemak Ikan Lele (*Clarias* sp.) 16
2.5 Garam 17
2.6 GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) 18

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN **20**
3.1 Materi Penelitian 20
3.1.1 Alat Penelitian 20
3.1.2 Bahan Penelitian 20
3.2 Metode Penelitian 21
3.3 Analisis Data 23
3.4 Prosedur Penelitian 24
3.5 Persiapan penelitian 25
3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan 25
3.5.2 Pembuatan Larutan Natrium Fisiologis (Na-Fis) 26
3.5.3 Pembuatan Media TSA 27
3.5.4 Pembuatan Media NA 27

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

3.5.5 Pembuatan Media RS 28
3.5.6 Pembuatan Media TSB 29
3.5.7 Inokulasi dan Peremajaan *Aeromonas hydrophila* 30
3.5.8 Uji Biokimia 30
3.5.9 Uji Kepadatan *Aeromonas hydrophila* 34
3.5.10 Penentuan Dosis Infeksi 35
3.6 Penelitian Utama 36
3.6.1 Infeksi *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele (*Clarias* sp.) dan Perlakuan Garam 36
3.6.2 Uji *Total Plate Count* (TPC) 38
3.6.3 Uji Kadar Garam 39
3.6.4 Uji Kadar Lemak 40
3.6.5 Uji Angka Peroksida 41
3.6.6 Uji Profil Asam Lemak 43

4. HASIL DAN PEMBAHASAN 46
4.1 Uji Biokimia *Aeromonas hydrophila* 46
4.2 Uji Kepadatan *Aeromonas hydrophila* 49
4.3 Dosis Infeksi *Aeromonas hydrophila* 50
4.4 Hasil Uji *Total Plate Count* (TPC) 50
4.4.1 Analisis Pengaruh Konsentrasi Garam Berbeda terhadap Nilai TPC 52
4.4.2 Analisis Pengaruh Infeksi *Aeromonas hydrophila* terhadap Nilai TPC 55
4.5 Hasil Uji Kadar Garam 57
4.6 Hasil Uji Kadar Lemak 60
4.6.1 Analisis Pengaruh Konsentrasi Garam Berbeda terhadap Kadar Lemak 61
4.6.2 Analisis Pengaruh Infeksi *Aeromonas hydrophila* terhadap Kadar Lemak 64
4.7 Hasil Uji Angka Peroksida 66
4.7.1 Analisis Pengaruh Konsentrasi Garam Berbeda terhadap Angka Peroksida 67
4.7.2 Analisis Pengaruh Infeksi *Aeromonas hydrophila* terhadap Angka Peroksida 69
4.8 Profil Asam Lemak 71

5. PENUTUP 84
5.1 Kesimpulan 84
5.2 Saran 84

DAFTAR PUSTAKA 85
LAMPIRAN 96

repository.ub.ac.id

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

1. Komposisi nilai gizi daging ikan lele (*Clarias* sp.) 7
2. Profil asam lemak minyak ikan lele (*Clarias* sp.) 17
3. Struktur rancangan percobaan 22
4. Tabel *Analisis of Variance* (ANOVA) pada rancangan acak lengkap 23
5. Spesifikasi alat GC-MS 44
6. Hasil uji biokimia 46
7. Kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada media NA 49
8. Hasil uji TPC pada media non-selektif (NA) 51
9. Hasil uji TPC pada media selektif (RS) 51
10. Hasil uji kadar garam 57
13. Hasil uji kadar lemak 60
16. Hasil uji angka peroksida 66
19. Perbandingan waktu retensi pada hasil kromatogram tiap sampel 71
20. Perbandingan prosentase area pada hasil kromatogram tiap sampel 75

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR GAMBAR

Gambar Halaman

1. Morfologi ikan lele 6
2. Morfologi *Aeromonas hydrophila* 8
3. Struktur kimia lemak 13
4. Komponen alat GC-MS 19
5. Hasil pewarnaan gram *A. hydrophila* dengan perbesaran 100X 47
6. Hasil uji TSIA *Aeromonas hydrophila* 48
7. Hasil uji gelatin *Aeromonas hydrophila* 48
8. Hasil uji hemolisis *Aeromonas hydrophila* 49
10. Diagram rata-rata *Total Plate Count* (TPC) non-selektif 52
11. Diagram rata-rata *Total Plate Count* (TPC) selektif 53
12. Diagram rata-rata TPC (*Total Plate Count*) non-selektif (NA) 55
13. Diagram rata-rata TPC (*Total Plate Count*) selektif (RS) 55
14. Diagram rata-rata kadar garam 58
15. Diagram rata-rata kadar lemak 61
16. Diagram rata-rata kadar lemak 64
17. Diagram rata-rata angka peroksida 67
18. Diagram rata-rata angka peroksida 69
19. Histogram prosentase *peak* asam lemak dominan 75

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Halaman

1. Pembuatan larutan Na-Fis 96
2. Pembuatan media TSA 97
3. Pembuatan media NA 98
4. Pembuatan media RS 99
5. Pembuatan media TSB 100
6. Peremajaan *Aeromonas hydrophila* 101
7. Pewarnaan gram dan pengamatan morfologi *Aeromonas hydrophila* 102
8. Uji gelatin *Aeromonas hydrophila* 103
9. Uji TSIA *Aeromonas hydrophila* 104
10. Uji hemolisin *Aeromonas hydrophila* 105
11. Uji kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila* 106
12. Infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele (*Clarias* sp.) dan perlakuan penambahan garam 107
13. Uji TPC (*Total Plate Count*) 108
14. Perhitungan TPC pada uji kepadatan bakteri 109
15. Uji kadar garam (metode titrasi argentometri) 110
16. Uji kadar lemak (SNI 01-2354.3-2006) 111
17. Uji angka peroksida 112
18. Uji profil asam lemak 114
19. Dokumentasi pembuatan larutan Na-Fis 116
20. Dokumentasi pembuatan media TSA 117
21. Dokumentasi pembuatan media NA 118
22. Dokumentasi pembuatan media RS 119
23. Dokumentasi pembuatan media TSB 120
24. Dokumentasi peremajaan *Aeromonas hydrophila* 121
25. Dokumentasi pewarnaan gram *Aeromonas hydrophila* 122
26. Dokumentasi uji gelatin 123
27. Dokumentasi uji TSIA 124
28. Dokumentasi uji hemolisin 125
29. Dokumentasi uji kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila* 126
30. Dokumentasi infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan perlakuan garam 127
31. Dokumentasi uji TPC pasca-panen 128
32. Hasil uji kadar lemak *wet basis* 129
33. Hasil kromatogram pada uji profil asam lemak 130
34. Hasil analisis uji TPC non-selektif dengan aplikasi SPSS 135
35. Hasil analisis uji TPC selektif dengan aplikasi SPSS 136
36. Hasil analisis uji kadar garam dengan aplikasi SPSS 137
37. Hasil analisis uji angka peroksida dengan aplikasi SPSS 139
38. Hasil analisis uji kadar lemak dengan aplikasi SPSS 141

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan air tawar khususnya ikan lele merupakan ikan yang menjadi primadona masyarakat lokal. Selain murah dan mudah didapat, lele menawarkan nilai gizi yang tinggi (Rejeki, *et al*., 2016). Kandungan gizi ikan lele menurut Ubadillah dan Hersoelistyorini (2010) meliputi protein (17,7 %), lemak (4,8 %), mineral (1,2 %), dan air (76 %). Ikan lele menurut Olgunoglu (2017) juga memiliki potensi asam lemak esensial yang cukup tinggi, yaitu *Alpha Linolenic Acid* (ALA) sebanyak 1,91 g/100 gram, *Eicosapentaenoic Acid* (EPA) sebanyak 4,67 g/100 gram, dan *Docohexaenoic Acid* (DHA) sebanyak 8,88 g/100 gram. ALA, EPA, dan DHA merupakan golongan asam lemak esensial yang dibutuhkan oleh tubuh dari suplai makanan. Hal ini dikarenakan tubuh tidak dapat memproduksi asam lemak esensial. Selain itu, asam lemak omega-3 memiliki peran penting dalam pencegahan penyakit kardiovaskular (Effiong dan Fakunle, 2013).

Permintaan pasar yang semakin tinggi menyumbang kenaikan produksi nasional ikan lele. Hal ini dapat dilihat dari data statistik lima tahun terakhir yang terus meningkat. Pada tahun 2008, volume produksi nasional ikan lele sebesar 114.371 ton, tahun 2009 menjadi 144.755 ton, dan makin meningkat secara signifikan hingga tahun 2012 menjadi 441.217 ton (Badan Pusat Statistik, 2012).

Akan tetapi, meningkatnya intensitas kegiatan budidaya lele yang diterapkan dapat memicu timbulnya gangguan-gangguan penyakit pada ikan lele, baik yang dilaksanakan secara intensif ataupun ekstensif. Padat tebar yang terlalu tinggi akan menimbulkan persaingan oksigen dan ruang gerak antar organisme budidaya. Hal ini mengakibatkan timbulnya penyakit, dapat berupa bakteri, parasit, dan virus. Penyakit bakteri yang menyerang ikan lele merupakan penyakit infeksius. Ketidakserasian antara komponen lingkungan, biota, dan organisme

penyebab penyakit (Suwarno, *et al*., 2014). Penyakit bakterial pada ikan dapat disebabkan oleh beberapa jenis bakteri, seperti *Aeromonas* sp., *Streptococcus* sp., *Vibrio* sp., dan *Pseudomonas* sp. Jenis penyakit bakteri ini dapat menyebabkan penyakit sistematik yang dapat menimbulkan kematian besar pada kegiatan budidaya (Arwin, *et al*., 2016). Penyakit yang menyerang ikan lele menurut Octaviana, *et al.* (2015) sering disebabkan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan menimbulkan penyakit MAS (*Motile Aeromonad Septicemia*).

Aeromonas hydrophila bersifat patogen dan memproduksi eksotoksin dan juga endotoksin. Faktor eksotoksin dapat berupa hemolisin yang melisiskan sel darah merah dan membebaskan hemoglobin sehingga darah keluar melalui luka. Efek eksotoksin yang berkelanjutan akan mengakibatkan kerusakan sel-sel jaringan tubuh sehingga terlihat gejala klinis berupa kerusakan daging (Istikhanah, *et al.*, 2014). Kerusakan daging diakibatkan oleh banyaknya kandungan protein pada jaringan otot dan saluran darah yang dibutuhkan oleh enzim-enzim eksotoksin yang dihasilkan *Aeromonas hydrophila* (Triyaningsih, *et al.*, 2014).

Upaya pencegahan terhadap infeksi bakteri yang umum digunakan selama ini ialah penggaraman. Garam mampu menurunkan aktivitas air melalui proses plamolisis sehingga terjadi ketidakseimbangan cairan osmosis yang mengakibatkan sel kehilangan air (Pianetti, *et al.*, 2008). Selain perannya sebagai penghambat aktivitas mikroba, penambahan garam dengan konsentrasi yang semakin tinggi pada daging ikan akan semakin meningkatkan nilai kadar lemak. Hal ini disebabkan menurunnya aktivitas enzim lipolitik yang berfungsi memecah lemak menjadi asam lemak (Thariq, *et al.*, 2014).

Beberapa penelitian telah membuktikan patogenitas *Aeromonas hydrophila* baik pada ikan maupun manusia. Akan tetapi, masih belum banyak data yang menginformasikan mengenai profil asam lemak daging ikan lele yang telah terinfeksi *Aeromonas hydrophila* yang diolah dengan penambahan garam pada

konsentrasi yang berbeda. Aktivitas *Aeromonas hydrophila* pada daging ikan lele diduga dapat merusak susunan asam lemak yang ada sehingga konsumen tidak dapat memenuhi kebutuhan gizi. Padahal, kandungan gizi berupa asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) dibutuhkan oleh tubuh untuk memenuhi kebutuhan gizi asam lemak. Oleh karena itu, diperlukan adanya perlakuan yang dapat mempertahankan susunan asam lemak dan menghambat pertumbuhan bakteri, salah satunya dengan penambahan garam pada konsentrasi yang berbeda.

1.2 Perumusan Masalah

Perumusan masalah dari penelitian ini yaitu apakah perlakuan penambahan garam pada konsentrasi berbeda baik sebelum dan sesudah infeksi *Aeromonas hydrophila* berpengaruh terhadap profil asam lemak daging ikan lele (*Clarias* sp.)?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendapatkan profil asam lemak daging ikan lele (*Clarias* sp.) sebelum dan sesudah infeksi *Aeromonas hydrophila* setelah diberikan perlakuan garam dengan konsentrasi berbeda.

1.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

H0 : diduga penambahan garam dengan konsentrasi berbeda tidak berpengaruh terhadap profil asam lemak daging ikan lele (*Clarias* sp.) baik sebelum dan sesudah terinfeksi *Aeromonas hydrophila*

H1 : diduga penambahan garam dengan konsentrasi berbeda berpengaruh terhadap profil asam lemak daging ikan lele (*Clarias* sp.) baik sebelum dan sesudah terinfeksi *Aeromonas hydrophila*

1.5 Kegunaan

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai profil asam lemak daging ikan lele (*Clarias* sp.) baik sebelum dan sesudah terinfeksi *Aeromonas hydrophila.* Sehingga masyarakat dapat memahami pentingnya keamanan pangan. Selain itu, penelitian ini juga diharapkan dapat berkembang lebih luas lagi.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember—Maret di Laboratorium Ilmu Teknologi Hasil Perikanan Divisi Keamanan Hasil Perikanan dan Divisi Perekayasaan Hasil Perikanan, Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Parasit dan Penyakit Ikan dan Divisi Reproduksi Ikan, Laboratorium Hidrobiologi Divisi Sumberdaya Ikan, Laboratorium Sentra Ilmu Hayati (LSIH), dan Laboratorium Gizi, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Airlangga, Surabaya.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Lele (*Clarias* sp.)

Budidaya ikan lele (*Clarias* sp.) menurut Anggraeni, *et al*. (2016) mengalami perkembangan yang pesat. Hal ini dikarenakan kemudahan dalam pemeliharaan dan pembudidayaan, dapat dilakukan secara intensif di lahan yang sempit, pertumbuhannya cepat, serta teknologi pembudidayaan yang mudah dikuasai oleh masyarakat. Adapun klasifikasi ikan lele (*Clarias* sp.) menurut Ismail, *et al.* (2014) ialah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Sub-kingdom : Metazoa
Phyllum : Chordata
Sub-phyllum : Vertebrata
Kelas : Pisces
Sub-kelas : Teleostei
Ordo : Ostariophysi
Sub-orde : Siluroidea
Famili : Clariidae
Genus : *Clarias*
Spesies : *Clarias* sp.

Lele (*Clarias* sp.) mempunyai ciri-ciri morfologi antara lain: kepala pipih, simetris dan dari kepala sampai punggung berwarna coklat kehitaman, mulut lebar dan tidak bergerigi, bagian badan bulat dan memipih ke arah ekor, memiliki patil serta memiliki alat pernapasan tambahan (*accesory breathing organ*) berupa kulit tipis menyerupai spons, yang dengan alat pernapasan tambahan ini lele dapat hidup pada air dengan kadar oksigen rendah. Ikan ini memiliki kulit berlendir dan tidak bersisik (mempunyai pigmen hitam yang berubah menjadi pucat bila terkena cahaya matahari), dua buah lubang penciuman yang terletak di belakang bibir atas, sirip punggung dan anal memanjang sampai ke pangkal ekor namun tidak menyatu dengan sirip ekor, mempunyai senjata berupa patil atau taji untuk

melindungi dirinya terhadap serangan atau ancaman dari luar yang membahayakan (Widodo, 2009). Morfologi ikan lele disajikan pada Gambar 1.

Gambar 1. Morfologi ikan lele
(Iswanto dan Suprapto, 2015)

Habitat ikan lele menurut Suyanto (2007) adalah semua perairan air tawar. Lele tidak pernah ditemukan hidup di air payau atau asin. Di sungai yang airnya tidak terlalu deras atau perairan yang tenang, seperti danau, waduk, telaga, rawa, serta genangan kecil merupakan lingkungan hidup ikan lele. Lele menurut Maishela, *et al.* (2013) merupakan hewan nokturnal yang aktif mencari makan pada saat kondisi lingkungan gelap. Lele cenderung menghindari sumber cahaya ketika siang hari.

Ikan lele memiliki daging dengan rasa yang lezat, daging yang empuk dan lembut. Selain itu, lele memiliki susunan duri yang teratur sehingga mudah untuk dikonsumsi (Jayani, *et al.*, 2016). Tak heran jika ikan lele menjadi primadona bagi masyarakat. Hal ini dikarenakan selain memiliki cita rasa yang enak, ikan lele memiliki kandungan gizi yang lengkap. Adapun kandungan gizi ikan lele dalam %b/b dapat dilihat di kolom A dan dalam prosentase di kolom B disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi nilai gizi daging ikan lele (*Clarias* sp.)

Zat Gizi	Kandungan Gizi	
	A*) (%b/b)	B**) (%)
Protein	17,09 ± 0,52	20,83 ± 0,15
Lemak	2,75 ± 0,23	13,86 ± 0,02
Air	78,05 ± 0,27	ND
Abu	1,25 ± 0,50	4,05 ± 0,05
Karbohidrat	0,86 ± 0,32	3,85 ± 0,02

Keterangan: ND = Tidak ada data

Sumber: *) Listyarini, *et al*., 2018.
**) Adeniyi, *et al.*, 2012.

2.2 *Aeromonas hydrophila*

Pustaka mengenai klasifikasi, morfologi, pertumbuhan, dan perkembangan bakteri *Aeromonas hydrophila* disajikan dalam sub bab berikut.

2.2.1 Deskripsi dan Klasifikasi *Aeromonas hydrophila*

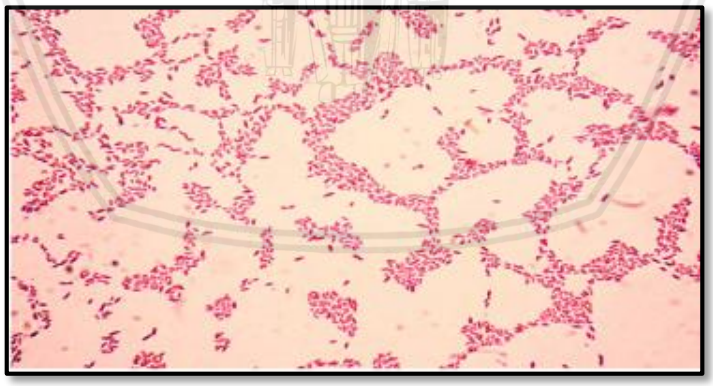
Aeromonas hydrophila merupakan bakteri patogen golongan gram negatif yang dapat menyebabkan kematian ikan dalam waktu yang singkat. Bakteri ini menyerang hewan khususnya ikan akan tetapi juga dapat bersifat patogen pada manusia. *Aeromonas hydrophila* dikenal sebagai bakteri oportunistik yang menyebabkan penyakit bakterial pada ikan seperti pembusukan sirip dan *acute septicemia* (Muslikha, *et al.*, 2016). Beberapa studi telah mengisolasi bakteri *Aeromonas hydrophila* dari makanan, air minum, dan lingkungan perairan akuatik. Bakteri ini semakin diakui sebagai bakteri patogen enterik yang dapat menyebabkan diare pada manusia (Agger, 1986). Adapun klasifikasi *Aeromonas hydrophila* menurut Janda dan Abbott (2010) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Filum : Protophyta
Kelas : Schizomycetes
Ordo : Pseudanonadeles
Famili : Vibrionaceae
Genus : *Aeromonas*
Spesies : *Aeromonas hydrophila*

2.2.2 Morfologi *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila merupakan bakteri golongan gram negatif yang memiliki bentuk batang pendek, rantai pendek, diameternya 0,3 hingga 1,0 µm, bergerak menggunakan single polar flagellum, fermentatif, dan fakultatif anaerob. Sehingga, dapat tumbuh optimal pada suhu 22—28° C dan dapat menghasilkan gas dan asam, oksidase positif dan katalase positif, urease negatif, dan uji gelatin positif (Prayogi, *et al*., 2016).

Aeromonas hydrophila yang diisolasikan pada agar akan membentuk koloni berwarna putih sampai kuning tua. Selain itu, koloninya berbentuk bulat namun secara morfologi berbentuk batang pendek dengan ukuran bervariasi (lebar: 0,8—1,0 mikron; panjang: 1,0—3,5 mikron), dan bersifat motil. Morfologi koloni permukaannya agak menonjol, mengilat, krem dengan tepian *entire* serta berdiameter 2—3 mm (Arwin, *et al.*, 2016). *Aeromonas hydrophila* dapat tumbuh pada kisaran suhu 25—30°C (Lukistyowati dan Kurniasih, 2012). Adapun morfologi *Aeromonas hydrophila* disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Morfologi *Aeromonas hydrophila*
(Samsundari, 2006)

2.2.3 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila dapat ditemukan hidup di perairan budidaya ikan bahkan hingga makanan. *Aeromonas hydrophila* mampu bertahan hidup pada lingkungan yang tidak stabil atau terus mengalami perubahan. Seperti yang telah

ditemukan bahwasannya *Aeromonas hydrophila* memiliki viabilitas hidup hingga rentang yang cukup luas dari suhu 40°C hingga 4°C. Faktor lingkungan yang turut mempengaruhi pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* diantaranya suhu, nutrisi, pH, glukosa, salinitas, keseimbangan osmotik, dan waktu inkubasi (Awan, *et al.*, 2018).

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri mesofilik yang hidup pada suhu optimum 37°C. *Aeromonas hydrophila* mampu menghasilkan toksin, diantaranya α dan β hemolisin, enterotoksin, dan endotoksin (Blaszk, 2014). *Aeromonas hydrophila* dapat berkembang biak dengan baik pada kondisi lingkungan yang buruk. Kemampuan bakteri ini dalam menginfeksi ikan ditentukan oleh kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim dan toksin tertentu. Enzim yang berperan dalam proses invasi dan infeksi diantaranya kitinase dan lesitinase. *Aeromonas hydrophila* bekerja dengan mendegradasi jaringan dan menimbulkan luka yang mengakibatkan pendarahan pada ikan (Mangunwardoyo, *et al.*, 2010).

2.2.4 Patogenitas *Aeromonas hydrophila*

Beberapa studi tentang paparan *Aeromonas hydrophila* pada ikan salah satunya menunjukkan gejala klinis berupa pergerakan ikan yang lambat, sering berenang ke permukaan, pendarahan pada sirip, dan bercak merah yang ditemukan pada usus (Kumar, *et al*., 2016). Laith dan Najiah (2013) mengungkapkan gejala klinis infeksi *Aeromonas hydrophila* diantaranya terdapat lesi kulit disertai pendarahan fokal dan pendarahan pada sirip dada. *Aeromonas hydrophila* menyebabkan sepsis hemoragik, ditandai dengan luka dangkal kecil dan pendarahan lokal yang berkembang menjadi luka epidermis. Peradangan dapat terjadi pada organ serta gejala klinis lain yang mudah terlihat ialah adanya kekaburan pada satu atau kedua mata. Racun yang diproduksi oleh *Aeromonas hydrophila* dan produk ekstraseluler seperti hemolisin, protease, dan elastase dapat menyebabkan nekrosis parah di organ hati.

Proses invasi *Aeromonas hydrophila* ke tubuh ikan diawali dengan melekatnya bakteri pada permukaan kulit, selain itu flagel yang dimiliki *Aeromonas hydrophila* digunakan sebagai alat bergerak dan melekat kuat pada lapisan terluar tubuh ikan. Pada penelitian Mangunwardoyo (2010), lapisan terluar pada ikan nila merupakan sisik yang dilindungi oleh zat kitin. Bakteri *Aeromonas hydrophila* mampu menghasilkan enzim kitinase untuk mendegradasi lapisan kitin sehinga bakteri mudah masuk. Pada ikan lele yang tidak memiliki sisik, setelah mengalami pelekatan bakteri maka lele akan mengeluarkan banyak lendir sebagai pertahanan tubuhnya. Selain itu, *Aeromonas hydrophila* dapat memproduksi enzim lesitinase dan bekerja dengan cara merusak membran plasma sel dan dihidrolisis menjadi fosfokolin dan digliserida yang merupakan nutrisi yang sangat baik untuk bakteri. Hal ini yang menyebabkan masuknya *Aeromonas hydrophila* ke dalam aliran darah dan berkembang biak di dalam organ hati dan ginjal maupun organ penting lainnya. *Aeronomas hydrophila* sangat rentan menimbulkan penyakit pada ikan. Hal ini dijelaskan oleh Olga dan Fatmawaty (2012) bahwasannya patogenitas *Aeromonas hydrophila* pada ikan cukup tinggi, yaitu bervariasi pada kepadatan 10^4—10^6 sel/ml.

Ulcer dan hemoragik yang terjadi pada ikan yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila* merupakan akibat dari aktifnya sistem imun pada ikan yang terinfeksi. Respons imun yang terjadi mengaktifkan produksi polimorfonuklear leukosit seperti melanomakrofag, monosit, dan neutrofil yang berperan sebagai sel fagosit. Leuoksit yang aktif menyebabkan bakteri mengeluarkan toksin hemolisin sehingga terjadilah *ulcer* dan hemoragik pada kulit bahkan organ dalam ikan diikuti dengan kematikan sel atau jaringan (Mangunwardoyo, 2010).

Faktor virulensi yang paling sering ditemukan pada isolat *Aeromonas hydrophila* ialah gen aerolysin dan hylA. Gen aerolysin menurut Rahmaningsih (2018) merupakan protein ekstraseluler yang diproduksi oleh beberapa strain

Aeromonas hydrophila yang bisa larut, bersifat hidrofilik, hemolitik, dan sitolitik. Ditambahkan oleh Arwin, *et al.* (2016) toksin aerolysin bekerja dengan mengikat reseptor glikoprotein spesifik pada permukaan sel eukariot lalu membentuk lubang dan melintas masuk ke dalam membran bakteri sebagai preprotoksin yang megandung peptida. Selain itu, Laith dan Najiah (2013) menemukan lipase dan hidrolipase yang merupakan faktor virulensi penyebab perubahan struktur membran sitoplasma dari inang sehingga akan memperburuk patogenitas, terutama jika terdapat gen aerolysin. Selain itu, aktivitas hemolitik *Aeromonas hydrophila* sebagai β-hemolisin merupakan indikator enterotoksisitas yang mematikan bagi ikan. Isolat *Aeromonas hydrophila* ini telah ditemukan dapat menyebabkan enterotoksigenik dan diare jika ikan dikonsumsi tanpa melalui proses pengolahan yang benar.

Penelitian tentang pengaruh suhu, pH, konsentrasi garam pada pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* telah dilakukan oleh Vivekanandhan, *et al*. (2003). Hasil pengaruh konsentrasi garam terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* mengungkapkan bahwa pada konsentrasi NaCl 0,5%, 1,0%, dan 2,0% dengan suhu 30°C pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* terlihat normal. Pertumbuhan akan semakin menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi garam. Pada konsentrasi 5,0% tidak ditemukan adanya pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* pada medium.

Salah satu faktor sitotoksik yang potensial dihasilkan oleh *Aeromonas hydrophila* ialah sitotoksik enterotoksin. Krzyminska, *et al.* (2012) mengemukakan dalam penelitiannya bahwa interaksi antara sitolitik enterotoksin yang diisolasi dari *Aeromonas hydrophila* dengan jaringan epitel menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Nitric Oxide Radicals* (NO) yang menyebabkan semakin tingginya sitotoksisitas. Ditambahkan oleh Anggarasari, *et al*. (2014) ROS dan NO bersifat radikal yang mana keberadaannya yang berlebihan dapat menyebabkan

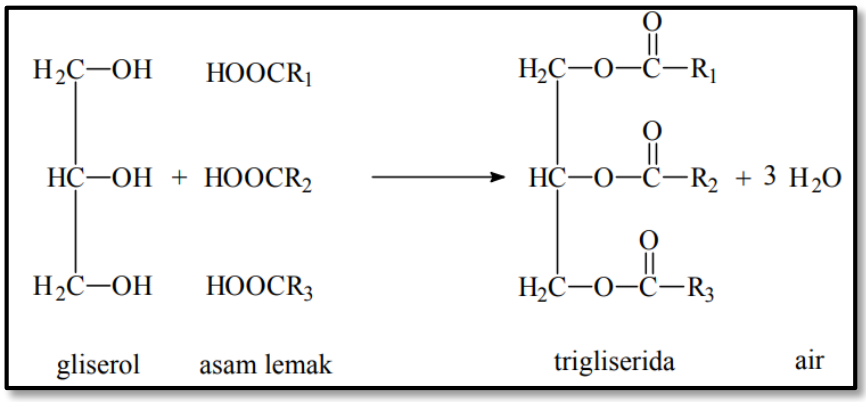
stres oksidatif dimana terjadi ketidakseimbangan antara prooksidan dan antioksidan. Kelebihan radikal bebas ini menyebabkan terjadinya modifikasi lipid, DNA, dan protein, yang selanjutnya dapat mengakibatkan kerusakan jaringan dan kematian sel.

2.3 Lemak dan Minyak

Pustaka mengenai pengertian minyak, lemak ikan, dan minyak ikan disajikan pada sub bab berikut.

2.3.1 Pengertian Lemak dan Minyak

Lemak menurut Santika (2016) merupakan suatu molekul yang merupakan susunan oksigen, hidrogen, karbon, dan beberapa dijumpai nitrogen dan fosforus. Lemak bersifat tidak mudah larut dalam air. Pada dasarnya, molekul lemak terdiri atas 4 bagian dimana terdapat 1 molekul gliserol dan 3 molekul asam lemak. Ditambahkan oleh Pranowo dan Muchalal (2004), lemak merupakan ester dari 1 molekul gliserol dan tiga molekul asam lemak yang disebut dengan triasil gliserol atau trigliserida. Molekul trigliserida ini merupakan hasil dari kondensasi membentuk tiga molekul air. Asam lemak pada trigliserida menjadi kunci terhadap sifat fisika dan sifat kimia lemak, biasanya merupakan asam organik dengan rantai karbon sebanyak 16 hingga 24 atom per molekul. Adapun struktur kimia lemak dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur kimia lemak
(Pranowo dan Muchalal, 2004)

Lemak dan minyak memiliki perbedaan pada bentuk fisik yaitu pada suhu kamar lemak berbentuk padat sedangkan minyak memiliki bentuk cair. Berdasarkan susunannya, lemak tersusun oleh asam lemak jenuh sedangkan minyak tersusun oleh asam lemak tidak jenuh (Almunady, 2012). Lemak memiliki fungsi fisiologis yang baik sebagai sumber energi selain karbohidrat. Sebanyak 1 gram lemak memberikan 9 kalori (2 ¼ x energi yang dibebaskan dari 1 gram protein maupun 1 gram karbohidrat). Karbohidrat dan protein hanya menghasilkan 4 kalori per 1 gram. Energi yang berlebihan dalam tubuh akan disimpan dalam jaringan adiposa sebagai energi potensial (Suhardjo dan Kusharto, 1992).

2.3.2 Lemak Ikan

Lemak ikan menurut Manduapessy (2017) dikenal sebagai sumber asam lemak tidak jenuh tunggal maupun ganda. Ikan mengandung asam lemak jenuh sebanyak 25% dan asam lemak tidak jenuh sebanyak 75%. Asam lemak tak jenuh ganda (*Poly Unsaturated Fatty Acid*) dalam tubuh akan berperan dalam proses tumbuh kembang otak, perkembangan indera penglihatan serta sistem kekebalan tubuh bagi bayi. Pada beberapa jenis ikan, tempat penumpukan lemak berada pada organ hati, namun, beberapa jenis ikan penumpukan lemak yang utama ada

di bagian daging. Asam lemak yang dominan ditemukan pada ikan ialah EPA dan DHA (Sukarsa, 2004).

2.3.3 Minyak Ikan

Minyak ikan merupakan salah satu zat gizi esensial yang sangat dibutuhkan oleh tubuh dikarenakan mengandung asam lemak tak jenuh (75%) yang kaya manfaat. Minyak ikan hanya memiliki sebanyak 25% kandungan asam lemak jenuh. Asam lemak tak jenuh diantaranya ialah DHA, ARA, dan EPA. Kandungan minyak di dalam ikan tergantung pada jenis ikan, jenis kelamin, umur, musim, siklus bertelur, letak geografi perairan, dan jenis makanan yang dikonsumsi (Almunady, 2012). Minyak ikan memiliki sifat mudah teroksidasi oleh udara, mudah terhidrolisis, dapat tersabunkan dan dapat berpolimerisasi. Minyak ikan juga memiliki sifat-sifat fisika diantaranya, berwarna kuning keemasan, berat jenis lebih kecil dibanding air, memiliki derajat kekentalan, dan dapat membiaskan cahaya dengan sudut spesifik (Pandiangan, *et al.*, 2019).

2.4 Asam Lemak

Amahorseja (2018) menyatakan bahwa asam lemak pada umumnya merupakan asam-asam monokarboksilat tanpa rantai yang bercabang dan memiliki jumlah atom karbon genap yang selanjutnya dibagi menjadi dua golongan, yakni asam lemak jenuh dan asam lemak tidak jenuh. Perbedaannya terletak pada struktur kimia asam lemak tersebut. Asam lemak jenuh tidak memiliki ikatan rangkap, sedangkan asam lemak tidak jenuh berikatan rangkap. Hal ini menyebabkan perbedaan sifat fisik maupun kimia pada kedua asam lemak tersebut. Asam lemak dibedakan berdasarkan kejenuhannya menjadi dua, yaitu asam lemak jenuh (*Saturated Fatty Acid/SFA*) dan asam lemak tak jenuh (*Unsaturated Fatty Acid*).

2.4.1 Asam Lemak Jenuh

Asam lemak jenuh menurut Sartika (2008) merupakan asam lemak yang tidak memiliki ikatan rangkap pada atom karbon. Sehingga, kemampuan dalam menangkal radikal bebas sangat rendah dibandingkan dengan asam lemak tidak jenuh. Asam lemak jenuh dapat memberikan dampak buruk bagi kesehatan, diantaranya menimbulkan peningkatan kadar kolesterol total dan K-LDL (kolesterol LDL).

Ditambahkan oleh Tuminah (2009), asam lemak jenuh merupakan asam lemak normal yang dibuat oleh tubuh dan digunakan dalam perlawanan terhadap virus, bakteri, dan protozoa serta mendukung sistem kekebalan tubuh. Asupan asam lemak jenuh dalam jumlah yang banyak akan meningkatkan kadar LDL yang mana sekaligus meningkatkan kadar HDL. Hal ini mengakibatkan naiknya jumlah kolesterol dalam darah. Jenis-jenis asam lemak jenuh menurut Setiawati, *et al*. (2016) diantaranya asam laurat (C12:0), asam miristast (C14:0), asam palmitat (C16:0), asam stearat (C18:0), dan asam arakhidat (C20:0).

2.4.2 Asam Lemak Tidak Jenuh

Asam lemak tak jenuh merupakan asam lemak yang memiliki ikatan rangkap pada rantai karbonnya sebanyak satu atau lebih ikatan rangkap. Asam lemak tak jenuh memiliki titik leleh lebih rendah apabila dibandingkan dengan titik leleh asam lemak jenuh. Asam lemak tidak jenuh sangat mudah mengalami perubahan kimia yang dikenal sebagai auto-oksidasi. Proses ini membutuhkan adanya udara dan pengaruh logam (Sumbono, 2015).

Asam lemak tak jenuh diakui dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah. Asam lemak tak jenuh dibagi ke dalam dua kelompok, yakni asam lemak tak jenuh yang hanya memiliki 1 ikatan rangkap atau *Mono Unsaturated Fatty Acid* (MUFA) dan asam lemak tak jenuh yang memiliki lebih dari 1 ikatan rangkap atau

Poly Unsaturated Fatty Acid (PUFA). Asam lemak tak jenuh tunggal atau MUFA membantu menurunkan kadar LDL dalam darah. Diantaranya terdapat pada minyak tumbuhan (asam palmitat dan oleat). Sedangkan PUFA berperan dalam menurunkan kadar kolesterol total, karena dalam jumlah besar tidak hanya menurunkan LDL akan tetapi juga HDL. Asam lemak tak jenuh jamak diantaranya banyak terdapat pada minyak ikan (Tuminah, 2009).

Asam lemak tak jenuh menurut Amahorseja (2018) dibagi menjadi tiga kelompok yakni omega-3, omega-6, dan omega-9. Pembagian ini didasarkan pada letak ikatan rangkap dihitung dari atom karbon terakhir atau gugus metil (CH_3). Menurut Panagan *et al.* (2012), bentuk paling umum dari omega-3 ialah eikosapentanoat (EPA) (C20:5) dan dokosapentanoat (DHA) (C22:6) yang mana terdapat pada minyak ikan. Selain EPA dan DHA, asam lemak omega-3 diantaranya merupakan asam α-linoleat (C18:3). Asam lemak omega-6 banyak terdapat dalam tumbuhan, diantaranya ialah asam linoleat (C18:2), asam γ-linoleat, asam arakhidonat (ARA) (C20:4), dan asam dokosatetraenoat. Sedangkan asam lemak omega-9 diantaranya ialah asam oleat dan asam erukat. Asam lemak omega-9 ini merupakan asam lemak non-esensial yang dapat disintesa oleh tubuh.

2.4.3 Profil Asam Lemak Ikan Lele (*Clarias* sp.)

Komposisi asam lemak pada minyak ikan lele (*Clarias* sp.) menurut Ngadiarti, *et al.* (2013) terdiri atas SFA, MUFA, dan PUFA yang mana masing-masing terdapat sebanyak 31,45%, 36,12%, dan 32,43%. Adapun kandungan asam lemak minyak ikan lele dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Profil asam lemak minyak ikan lele (*Clarias* sp.)

Nama Umum	(Cn-x)	Asam Lemak % (g/100 g lemak)
***Saturated Fatty Acid* (SFA)**		**31,45**
Asam laurat	(C12:0)	0,13
Asam miristat	(C14:0)	1,99
Asam palmitat	(C16:0)	22,75
Asam stearat	(C18:0)	6,14
Asam arakhidat	(C20:0)	0,22
Asam behenat	(C22:0)	0,10
Asam lignoserat	(C24:0)	1,11
***Monounsaturated Fatty Acid* (MUFA)**		**36,12**
Asam miristoleat	(C14:1)	0,04
Asam palmitoleat	(C16:1)	3,96
Asam oleat	(C18:1)	32,05
Asam erusat	(C22:1)	0,07
***Poliunsaturated Fatty Acid* (PUFA)**		**32,43**
Asam linoleat	(C18:2)	25,00
Asam γ-linoleat	(C18:3)	1,70
Asam arakhidonat	(C20:4)	0,07
Asam eikosapentanoat	(C20:5)	0,77
Asam dokosahesaenoat	(C22:6)	4,37
CLA		0,52
***Total Fatty Acid* (FA)**		**100,00**

Sumber: Ngadiarti, *et al.*, 2013.

Kandungan asam lemak pada ikan dapat dipengaruhi oleh berat dan umur ikan. Selain itu, beberapa penelitian telah menemukan bahwa pakan yang diberikan dapat berpengaruh dalam peningkatan kadar EPA dan DHA pada ikan lele. Pakan yang mengandung asam lemak omega-3 dapat meningkatkan kandungan EPA dan DHA dalam minyak ikan (Salasah, *et al*., 2016).

2.5 Garam

Garam merupakan bahan kimia yang sering dikonsumsi manusia untuk pengolahan makanan. Garam merujuk pada senyawa kimia dengan nama sodium klorida atau natrium klorida (NaCl). Selain sebagai penambah cita rasa pada makanan, garam dibutuhkan oleh tubuh manusia sebagai sumber elektrolit. Garam memiliki fungsi secara umum pada pengolahan makanan ialah sebagai pengawet,

penambah cita rasa, dan memperbaiki tekstur daging. Garam memiliki sifat bakteriostatik dan bakteriosidal yang mampu menunda pertumbuhan bakteri atau bahkan membunuh bakteri. Mekanisme garam dapat membunuh bakteri ialah dengan menarik air yang terdapat dalam tubuh ikan akibat tekanan osmosis yang berbeda (Assadad dan Utomo, 2011).

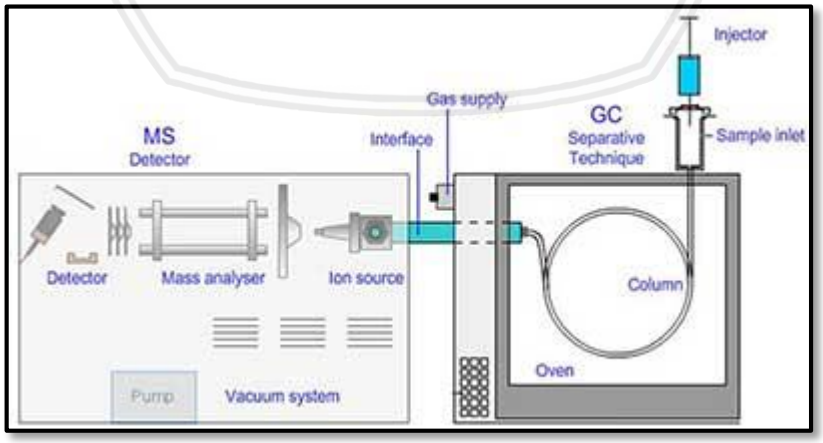
Bakteriostatik (daya hambat) dan bakteriosidal (daya bunuh) bekerja akibat aksi osmotik yang mana bahan pangan bertindak sebagai membran semipermeabel menurunkan kadar air sehingga garam berperan menghambat aktifitas bakteriologis dan enzimatis pada bahan pangan. NaCl dapat menghambat pertumbuhan bakteri karena dapat meningkatkan tekanan osmotik substrat sehinga terjadi penarikan air dari dalam sel bakteri sehingga bakteri akan kehilangan air dan menurunkan keseimbangan metabolisme yang terjadi dan akhirnya bakteri mati. Selain itu, NaCl dapat menurunkan kadar protein pada sel bakteri dan sangat bersifat toksik, yaitu menghasilkan ion Cl^- yang dapat menghambat respirasi sel mikroba (Amalia, *et al*., 2016).

2.6 GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

Teknik *Gas Chromatography* (GC) digunakan untuk mendeteksi senyawa-senyawa yang mudah menguap. Teknik ini diperkenalkan oleh James dan Martin pada tahun 1952. Senyawa-senyawa yang mudah menguap dispesifikasi lagi menjadi senyawa-senyawa yang mudah menguap pada keadaan vakum tinggi dan tekanan rendah serta dapat dipanaskan. GC memiliki dua fase, yakni fase gerak dan fase diam. Fase gerak berupa analit dan dielusi oleh fase gerak berupa gas. Cara kerjanya ialah dengan pemanasan oleh pipa pada fase gerak berupa gas yang bekerja di bawah tekanan, kemudian fase gerak disalut oleh analit (fase cair) sebagai fase diam. Fase diam cair atau analit kemudian dinaikkan ke atas kolom dengan pemanasan. Suhu pada oven dijaga agar meningkat secara bertahap

sehingga terjadi pemisahan antar komponen ketika sudah ada di dalam kolom. Proses pemisahan komponen-komponen pada analit atau fase diam akan berbeda-beda tergantung pada waktu relatif yang dibutuhkan komponen tersebut. Sedangkan prinsip kerja *Mass Chromatography* (MS) terdiri atas 4 prinsip kerja, yakni ionisasi, percepatan, pembelokkan, dan pendeteksian. Adapun molekul analit akan ditembakkan dengan elektron berenergi tinggi sehingga akan menghasilkan molekul berenergi positif. Molekul tersebut kemudian masuk ke dalam bagian medan magnet yang akan membelokkan ion tersebut sehingga dapat menentukan berat molekul massa. Setelah itu, detektor akan mendeteksi muatan yang dilewatkan di permukaan, kemudian massa akan di*scan* dan menghitung ion sebagai *mass to charge ratio* (m/z) (Darmapatni, *et al.,* 2016).

Teknik GC-MS adalah salah satu teknik terbaik untuk mengidentifikasi zat-zat yang mudah menguap, rantai panjang, hidrokarbon dengan rantai bercabang, alkohol, asam, ester, dan senyawa-senyawa yang lain. Identifikasi senyawa dikonfrimasi berdasarkan puncak area, waktu retensi, dan berat molekul serta rumus molekul (Diningrat, *et al.*, 2018). Adapun komponen alat GC-MS dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Komponen alat GC-MS
(Google Images, 2019)

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi pada penelitian ini meliputi alat dan bahan penelitian. Penjelasan mengenai alat dan bahan akan dijelaskan pada sub bab berikut.

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, ose loop, erlenmeyer, beaker glass, pipet tetes, gelas objek, *cover glass*, mikroskop cahaya binokuler, *Laminary Air Flow* (LAF) merk Biobase, bunsen, mikropipet 100—1000 µL merk Eppendrof, *bluetip*, spatula, gelas ukur, timbangan digital, timbangan analitik ketelitian 10^{-3} merk Radwag AS220, oven merk Memmert, inkubator merk Memmert, *showcase* merk Polytron, autoklaf manual, kompor, *crushable tang*, mortal, alu, aquarium, aerator, selang, nampan, baskom, pisau, talenan, *sectio set*, *washing bottle*, corong, spektrofotometer UV-Vis merk Heraeus, dan GCMS merk RTXI-1MS.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ikan lele (*Clarias* sp.), bakteri *Aeromonas hydrophila*, media NA (*Nutrient Agar*), media TSA (*Tryptone Soya Agar*), media TSB (*Tryptone Soya* Broth), media RS (Rhimler Shoots), media gelatin, *Blood Agar*, media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), Natrium Fisiologis (Na-Fis), violet ungu, iodin, alkohol 70%, safranin, aquades, garam merk Indomaret, kapas, alumunium foil, plastik wrap, spiritus, klorin, kertas label, tissue, sarung tangan lateks, masker, karet gelang, kertas bekas, plastik klip, botol vial plastik, dan pakan ikan merk CP 781-2.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian ilmiah menurut Noor (2011) merupakan kerangka kerja untuk melaksanakan penelitian ilmiah yang bersistem, yang merupakan suatu studi atau analisis mengenai suatu metode atau cara untuk mencapai tujuan. Penelitian ilmiah didasari pada pembuktian atas suatu pernyataan yang ingin diterima sebagai kebenaran yang harus dapat diverifikasi secara empiris (berdasarkan fakta).

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen menurut Prijana dan Rohman (2016) merupakan metode untuk menguji hipotesis, yakni menguji keterkaitan variabel bebas (*independent variable*) dan variabel terikat (*dependent variable*). Variabel bebas merupakan variabel yang dapat direkayasa. Sedangkan variabel terikat merupakan variabel yang bersifat konstan. Keterkaitan antara variabel bebas dan variabel terikat dapat diukur (*measurable*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keterkaitan antara variabel bebas berupa penambahan garam dengan konsentrasi yang berbeda terhadap variabel kontrol yaitu profil asam lemak daging ikan lele yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Penelitian ini meliputi dua tahap, yaitu persiapan penelitian dan penelitian utama. Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan perlakuan penambahan garam pada konsentrasi yang berbeda di daging ikan lele *(Clarias* sp.) kontrol dan penambahan garam pada konsentrasi yang berbeda pada daging ikan lele (*Clarias* sp.) yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan pola tiga kali pengulangan.

Penambahan garam pada daging ikan lele dilakukan dengan konsentrasi 0%, 5%, 10%, dan 15%. Adapun struktur rancangan percobaan pada penelitian ini disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Struktur rancangan percobaan

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
Tanpa Infeksi, Garam 0% (K 0%)	1K0%	2K0%	3K0%	K0%	K0%/n
Tanpa Infeksi, Garam 5% (K 5%)	1K5%	2K5%	3K5%	K5%	K5%/n
Tanpa Infeksi, Garam 10% (K 10%)	1K10%	2K10%	3K10%	K10%	K10%/n
Tanpa Infeksi, Garam 15% (K 15%)	1K15%	2K15%	3K15%	K15%	K15%/n
Infeksi, Garam 0% (AH 0%)	1AH0%	2AH0%	3AH0%	AH0%	AH0%/n
Infeksi, Garam 5% (AH 5%)	1AH5%	2AH5%	3AH5%	AH5%	AH5%/n
Infeksi, Garam 10% (AH 10%)	1AH10%	2AH10%	3AH10%	AH10%	AH10%/n
Infeksi, Garam 15% (AH 15%)	1AH15%	2AH15%	3AH15%	AH15%	AH15%/n
Total	**Y.1**	**Y.2**	**Y.3**	**Y..**	**Y../(t.n)**

Sumber: Data Primer, 2019.

Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan rancangan percobaan yang paling sederhana. RAL cocok digunakan untuk media percobaan yang relatif homogen yang mana tidak perlu dilakukan pengendalian lingkungan sehingga penempatan perlakuan ke dalam unit eksperimen dapat dilakukan secara acak sempurna atau lengkap (Soehono, 2016). Berikut bentuk umum model linier aditif dari Rancangan Acak Lengkap (RAL) menurut Adinugraha, *et al.* (2010):

$$Y_{ij} = \mu_i + \tau_i + \varepsilon_{ij} \text{ atau } Y_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:
i : 1, 2, … , t dan j = 1, 2, … , r
Y_{ij} : Pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j
μ : Rataan umum
τ_i : Pengaruh perlakuan ke-i
ε_{ij} : Pengaruh acak pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

3.3 Analisis Data

Setelah diperoleh data, maka langkah selanjutnya ialah menganalisis data untuk menghasilkan informasi. Tahap analisis data ini merupakan tahap yang paling penting, dimana data yang didapatkan akan dikumpulkan dengan menggunakan berbagai teknik pengumpulan data, diolah, hingga kemudian disajikan untuk membantu menemukan jawaban atas permasalahan yang diangkat (Qomari,2009).

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan analisis statistik keragaman atau ANOVA menggunakan *software* SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) versi 16.0. SPSS merupakan aplikasi program statistik dengan kemampuan perhitungan statistik yang tinggi. Uji ANOVA merupakan uji parametrik yang terdiri atas uji *one way* atau *two way*. Adapun komponen tabel sidik ragam uji ANOVA menurut Adinugraha dan Wijayaningrum (2010) disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Tabel *Analisis of Variance* (ANOVA) pada rancangan acak lengkap

Sumber Keragaman	**Derajat Bebas (db)**	**Jumlah Kuadrat (JK)**	**Kuadrat Tengah (KT)**	**F-hitung (Fhit)**	**F-tabel**	
					$F_{(5\%)}$	**$F_{(1\%)}$**
Perlakuan	t-1	JKP	KTP	KTP/KTG		
Galat	t(r-1)	JKG	KTG			
Total	**tr-1**	**JKT**				

Sumber: Adinugraha dan Wijayaningrum, 2010.

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah antar data homogen (sejenis) atau tidak. Pada aplikasi SPSS versi 16.0 dipilih *Homogenity Test* untuk melihat homogenitas data. Data dikatakan homogen apabila nilai *Sig* > 0,05. Apabila data telah homogen, maka dilihat nilai *Sig* pada tabel ANOVA. Hal ini bertujuan untuk mengetahui penerimaan terhadap hipotesis. Apabila nilai *Sig* pada tabel ANOVA < 0,05 maka dikatakan terima H1, yang berarti

bahwa data tersebut signifikan atau berbeda nyata (Sappu, *et al.*, 2014). Apabila terdapat perbedaan yang sangat nyata (atau nyata) antar rata-rata perlakuan maka analisis dapat dilanjutkan untuk mencari perbedaan antara rata-rata sepasang perlakuan. Hal ini bertujuan untuk mengetahui strain mana yang menghasilkan N tertinggi. Uji lanjut ini dilakukan menggunakan Duncan.

3.4 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam dua tahap, yakni persiapan penelitian dan penelitian utama. Persiapan penelitian yakni meliputi peremajaan bakteri *Aeromonas hydrophila* dari kultur murni ke media TSA, lalu dilakukan pengujian biokimia pada media gelatin, TSIA, *blood agar* serta pewarnaan gram untuk mempertegas ciri-ciri bakteri *Aeromonas hydrophila*. Bakteri *Aeromonas hydrophila* diuji kepadatannya menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) pada media NA sebagai N_2. Uji kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila* dilakukan untuk menentukan volume (V_2) bakteri *Aeromonas hydrophila* yang akan diinfeksi pada kolam ikan lele dengan volume (V_1) 50 liter.

Masuk ke dalam penelitian utama, yaitu dilakukan penginfeksian bakteri *Aeromonas hydrophila* pada kolam ikan lele (*Clarias* sp.) ukuran 40×60 cm dengan jumlah populasi ikan lele sebanyak 5 ekor tiap akuarium. Bakteri *Aeromonas hydrophila* diinfeksi pada kolam selama 7 hari pemeliharaan. Setelah 7 hari pemeliharaan, daging ikan lele baik yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* maupun tanpa penginfeksian dilakukan perlakuan penggaraman dengan konsentrasi yang berbeda yakni 0%, 5%, 10%, dan 15%. Sampel kemudian dilakukan pengujian kadar lemak, angka peroksida, profil asam lemak, TPC, dan kadar garam.

3.5 Persiapan penelitian

Proses persiapan penelitian diawali dengan peremajaan dari kultur murni, pengujian biokimia bakteri *Aeromonas hydrophila* pada media gelatin, TSIA, dan *blood agar*. Kemudian dilakukan pewarnaan gram dan pengamatan morfologi bakteri. Setelah itu, dilakukan uji kepadatan bakteri pada media NA menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*) sebagai N_2 sebelum diinfeksi pada kolam lele dengan cara perendaman.

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Tahap awal yang perlu dilakukan sebelum memulai proses kerja di laboratorium ialah sterilisasi alat dan bahan. Proses sterilisasi pada penelitian ini menggunakan dua macam sterilisasi, yakni sterilisasi basah dan sterilisasi kering. Sterilisasi basah menggunakan autoklaf manual bersuhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Sterilisasi basah digunakan untuk alat-alat setelah dan sebelum pemakaian serta untuk pembuatan media. Sedangkan sterilisasi kering menggunakan oven merk Memmert dengan suhu bervariasi yang dapat diatur sesuai tujuan penggunaan. Sterilisasi kering digunakan untuk alat-alat yang telah melalui proses sterilisasi basah. Sterilisasi bertujuan untuk membebaskan alat dan bahan dari mikroba yang mempengaruhi keberhasilan penelitian. Selain itu, selalu dilakukan pengkondisian aseptis untuk mencegah adanya penyebaran kontaminan dari luar tubuh ke media maupun dari isolat bakteri ke dalam tubuh. Teknik aseptis ini menggunakan dua metode, yaitu metode api bunsen dan metode alkohol 70% dengan cara *spray.*

Menurut Cahyani (2009), untuk kebanyakan benda, panas merupakan metode sterilisasi yang paling praktis dan efisien. Jumlah panas yang diperlukan untuk mematikan berbeda dari satu organisme ke organisme lain, yang harus diperhatikan adalah banyaknya panas (suhu) yang harus dipergunakan dan

lamanya waktu yang diperlukan benda yang disterilkan untuk dipanaskan pada suhu tertentu. Adapun sterilisasi kering menurut Andriani (2016) yaitu menggunakan oven dengan suhu 160—170°C selama 1—2 jam. Sterilisasi panas kering pada temperatur lebih dari 160^{o}C efektif menghancurkan mikroorganisme hidup dengan sebuah proses kehilangan kelembaban pada alat. Sterilisasi panas kering (oven) biasa digunakan untuk alat-alat gelas atau kaca (cawan petri dan tabung reaksi) dan bahan-bahan lain yang memiliki kemampuan bertahan pada suhu yang digunakan.

3.5.2 Pembuatan Larutan Natrium Fisiologis (Na-Fis)

Larutan Na-Fis digunakan sebagai pengenceran bertingkat sebelum uji kepadatan menggunakan metode TPC. Komposisi dasar larutan Na-Fis ialah garam NaCl sebanyak 9 gram untuk penggunaan akuades sebanyak 1000 ml. Larutan Na-Fis bersifat isotonis yang tidak mempengaruhi tekanan osmosis bakteri pada saat pengenceran bertingkat. Pada pembuatan Na-Fis untuk pengenceran bakteri ditimbang NaCl sebanyak 0,972 gram dan dilarutkan dalam 108 ml akuades. Kemudian didistribusikan dalam tabung reaksi sebanyak 12 tabung reaksi untuk dilakukan sterilisasi basah menggunakan autoklaf. Sedangkan Na-Fis untuk pengenceran sampel infeksi dan non-infeksi masing-masing sebanyak 3,159 gram dan 2,187 gram. Perbandingan sampel dengan larutan Na-Fis ialah 1:9. Adapun diagram alir pembuatan larutan Na-Fis disajikan pada Lampiran 1.

Tujuan dari pengenceran bertingkat menurut Yunita, *et al*. (2015) yaitu menurunkan kepadatan mikroba yang tersuspensi di dalam media. Sehingga, pada pengenceran selanjutnya didapatkan sejumlah 1/10 sel mikroorganisme dari pengenceran sebelumnya. Penentuan besarnya tingkat pengenceran tergantung pada perkiraan jumlah mikroba yang tersuspensi. Rasio yang digunakan ialah 1:9 (sampel:larutan). Pengenceran merupakan metode yang benar untuk

mendapatkan perhitungan jumlah mikroorganisme. Namun, pengenceran yang terlalu tinggi akan mengurangi kepadatan mikroorganisme. Pengenceran 10^{-1} dilakukan dengan mengambil 1 ml atau 1 gram sampel + 9 ml akuades dan seterusnya hingga pengenceran yang diinginkan.

3.5.3 Pembuatan Media TSA

Media TSA merupakan media untuk peremajaan bakteri *Aeromonas hydrophila* yang didapat dari kultur murni. Berdasarkan petunjuk penggunaan pada kemasan produk media TSA di laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, bahan dasar yang digunakan adalah TSA sebanyak 40 gram untuk penggunaan akuades 1000 ml. Bahan dasar TSA berbentuk serbuk yang berwarna kuning apabila telah larut dalam akuades. Media TSA merupakan media yang berbentuk solid. Selanjutnya sebanyak 0,8 gram serbuk TSA dilarutkan dalam 20 ml akuades di erlenmeyer, ditutup alumunium foil dan kertas kemudian direbus untuk mengaktifkan agar. Selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf. Setelah itu media didistribusikan dalam 2 tabung reaksi dan dimiringkan. Setelah membentuk gel, media siap untuk dipakai peremajaan bakteri *Aeromonas hydrophila.* Adapun diagram alir pembuatan media TSA disajikan pada Lampiran 2.

Media pertumbuhan bakteri untuk bakteri akuatik tawar yang baik ialah TSA (*Tryptic Soy Agar*) yang mana terdapat komposisi senyawa kimia penyusun media TSA yakni agar, *tryptone*, *soytone*, dan *sodium chloride*. Secara umum, sumber kultur media harus mengandung setidaknya, sulfur, karbon, nitrogen, fosfat, dan vitamin. Komponen-komponen ini merupakan sumber nutrisi bagi mikroorganisme (Dwinanti dan Tanbiyaskur, 2014).

3.5.4 Pembuatan Media NA

Media NA digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri pada uji kepadatan bakteri (N_1) menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC).

Berdasarkan petunjuk penggunaan pada kemasan produk media NA di laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, bahan dasar yang digunakan adalah NA sebanyak 20 gram untuk penggunaan akuades 1000 ml. Media NA merupakan media yang berbentuk solid. Penimbangan serbuk NA sebanyak 4 gram untuk uji kepadatan bakteri, sedangkan untuk TPC ditimbang sebanyak 21,6 gram pada sampel infeksi dan 21,2 gram pada sampel non-infeksi, selanjutnya serbuk dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditutup alumunium foil dan direbus untuk mengaktifkan agar. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf. Adapun diagram alir pembuatan media NA disajikan pada Lampiran 3.

Nutrient Agar (NA) merupakan media padat yang disusun oleh peptone dan menggunakan pemadat berupa agar, kemudian dicampur dengan ekstrak daging. Media NA merupakan media yang umum digunakan sebagai pertumbuhan sebagian besar bakteri. Dalam pembuatan medium yang mengandung pepton dan ekstrak daging, air yang digunakan merupakan air suling yang dapat menyebabkan endapan fosfat dan magnesium fosfat. Sedangkan sumber karbon didapat dari asam-asam amino ataupun glukosa (Rossita, *et al*., 2017).

3.5.5 Pembuatan Media RS

Media RS (*Rimler Shotts-Medium*) digunakan sebagai media uji kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila* secara selektif. Media RS merupakan media padat. Berdasarkan petunjuk penggunaan pada kemasan produk media RS di laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, bahan dasar yang digunakan adalah RS sebanyak 45,43 gram untuk penggunaan akuades 900 ml. Bahan dasar RS berbentuk serbuk yang berwarna hijau apabila telah larut dalam akuades. Selanjutnya dilakukan penimbangan media RS sebanyak 108,022 gram. Media dalam erlenmeyer kemudian ditutup alumunium foil dan kertas dan selanjutnya

disterilisasi menggunakan autoklaf. Adapun diagram alir pembuatan media RS disajikan pada Lampiran 4.

Agar *Rimler-Shotts* (RS) menurut Aboyadak, *et al*. (2017) digunakan untuk isolasi efektif dan identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila,* organisme yang memfermentasi maltosa dilihat dari koloni berwarna kuning yang terbentuk setelah inkubasi selama 24 jam. Menurut Hamny, *et al*. (2019), *Aeromonas hydrophila* yang tumbuh pada goresan *T-streach* media RS adalah koloni dengan karakteristik berwarna kuning tanpa titik hitam di tengahnya.

3.5.6 Pembuatan Media TSB

Media TSB digunakan sebagai media uji kepadatan bakteri sebelum diinfeksi pada kolam ikan lele dengan cara perendaman. Media TSB merupakan media cair yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Berdasarkan petunjuk penggunaan pada kemasan produk media TSB di laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, bahan dasar yang digunakan adalah TSB sebanyak 30 gram untuk penggunaan akuades 1000 ml. Selanjutnya ditimbang serbuk TSB sebanyak 7,5 gram dalam 250 ml akuades, ditutup alumunium foil dan kertas, lalu disterilisasi menggunakan autoklaf. Sebanyak 250 ml TSB digunakan sebagai media penanaman bakteri *Aeromonas hydrophila* sebelum dilarutkan dalam kolam. Adapun diagram alir pembuatan media TSB disajikan pada Lampiran 5.

Media TSB merupakan media pertumbuhan mikroorganisme yang disusun oleh kasein dan pepton kedelai yang mampu menyediakan kebutuhan asam amino dan nutrisi lainnya berupa nitrogen. Dekstrosa berperan sebagai sumber energi dan natrium klorida berperan sebagai penyeimbang tekanan osmotik (Setiaji, *et al.*, 2015). Media TSB mampu mendukung pertumbuhan sebagian besar organisme, baik aerob dan fakultatif anaerob (Scharlau, 2019).

3.5.7 Inokulasi dan Peremajaan *Aeromonas hydrophila*

Kultur murni bakteri *Aeromonas hydrophila* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Kultur murni yang didapatkan kemudian dilakukan peremajaan untuk memperbanyak arsip. Peremajaan dilakukan pada media TSA di tabung reaksi miring dengan metode *streak*. Inokulasi dilakukan dengan cara mengambil sebanyak satu ose bakteri *Aeromonas hydrophila* dari kultur murni. Proses ini dilakukan dalam kondisi aseptik melalui pemijaran ose loop pada api bunsen sebelum pengambilan bakteri kemudian didinginkan di pinggir media serta dilakukan pemanasan pada permukaan tabung reaksi media TSA agar aseptis. Proses peremajaan dilakukan secara aseptis di dalam *Laminary Air Flow* (LAF). Inokulat bakteri yang merupakan hasil dari proses inokulasi kemudian disimpan di dalam inkubator suhu 30°C selama 24 jam. Adapun diagram alir peremajaan *Aeromonas hydrophila* disajikan pada Lampiran 6.

Peremajaan bakteri merupakan suatu cara untuk merawat bakteri agar tetap memiliki nutrisi yang baik. Peremajaan dilakukan di dalam media miring dengan metode gores dan diinkubasi selama 24 jam (Yusriana, *et al*., 2014). Cara ini juga merupakan cara yang paling tradisional untuk menyimpan koleksi mikroba yang belum diketahui cara penyimpanan jangka panjangnya. Banyak bakteri yang dapat bertahan hidup dalam tabung miring hingga sepuluh tahun atau lebih baik di suhu ruang maupun kulkas (Machmud, 2001).

3.5.8 Uji Biokimia

Untuk mempertegas ciri-ciri bakteri *Aeromonas hydrophila* maka dilakukan uji biokimia. Uji biokimia terdiri atas uji presumtif (uji pendugaan) dan uji determinatif (penegasan). Menurut KIPM Yogyakarta (2018), uji presumtif meliputi uji pewarnaan gram, uji katalase, dan uji oksidase, sedangkan uji determinatif

meliputi uji TSIA, LIA (*Lysine decarboxylase*), uji *Motility*, uji produksi indol, uji oksidatif/fermentatif, uji gelatin, uji MR-VP, uji urea, uji sitrat, dan uji gua-gula. Inokulat yang didapatkan telah melalui tahap analisis *sequencing gen* di Laboratorium UIN Malang dan telah dikonfirmasi bahwa inokulat tersebut benar merupakan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Oleh karena itu, uji biokimia yang dilakukan pada penelitian ini hanya berupa uji pewarnaan gram, uji produksi gelatinase, uji produksi gas dan H_2S menggunakan media TSIA, dan uji hemolisis pada media *blood agar*.

- **Pewarnaan Gram dan Pengamatan Morfologi *Aeromonas hydrophila***

Pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui golongan bakteri gram positif atau negatif menggunakan reagen kristal violet, iodin, dan safranin. Pengamatan morfologi bakteri *Aeromonas hydrophila* menggunakan preparat yang dilihat melalui mikroskop dengan perbesaran 100X. Pewarnaan gram yang dilakukan mengacu pada metode SNI 2332.9:2011 yakni diawali dengan membuat usapan bakteri setipis mungkin pada preparat. Kemudian preparat difiksasi di dekat api bunsen yang menyala. Preparat diwarnai dengan larutan kristal violet selama 2 menit dan dicuci sebentar dengan akuades. Selanjutnya preparat dibubuhi dengan larutan iodin selama 1 ½ menit. Kemudian di cuci dengan akuades mengalir. Dekolorisasi (penghilangan warna) dilakukan setelahnya, menggunakan alkohol 70% dengan cara *spray*. Preparat kemudian dicuci kembali dengan akuades dan dilakukan pewarnaan sekunder menggunakan safranin selama 1 menit. Preparat dicuci kembali dengan akuades, dikeringkan, kemudian diamati di bawah mikroskop. Pengamatan morfologi bentuk *Aeromonas hydrophila* dilakukan sekaligus saat pengamatan hasil pewarnaan gram di bawah mikroskop. Adapun diagram alir pewarnaan gram *Aeromonas hydrophila* disajikan pada Lampiran 7.

Pada prinsip pewarnaan gram menurut Safrida, *et al.* (2012), bakteri gram positif ditandai dengan warna ungu yang menunjukkan bakteri tersebut mengikat reagen primer berupa kristal violet. Sedangkan pada bakteri gram negatif ditandai dengan warna merah yang menunjukkan bakteri tersebut tidak mampu mengikat pewarna primer berupa kristal violet. Bakteri yang tumbuh kemudian diamati bentuk sel secara mikroskopik sehingga dapat diketahui bentuknya apakah *coccus,* batang, atau spiral.

- **Uji Gelatin**

Uji gelatin bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim gelatinase dalam menghidrolisa gelatin menjadi asam amino. Media gelatin merupakan media semi solid. Uji gelatin dilakukan dengan mengambil satu ose bakteri *Aeromonas hydrophila* dan dicelupkan ke dalam media gelatin dalam tabung reaksi serta dihomogenkan agar petumbuhan merata. Selanjutnya media diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 24 jam. Setelah 24 jam inkubasi, media ditaruh ke dalam kulkas selama 15 menit untuk melihat kemampuan bakteri mempertahankan media tetap cair. Adapun diagram alir uji gelatin bakteri *Aeromonas hydrophila* disajikan pada Lampiran 8.

Metode uji gelatin menurut Samosir, *et al.* (2019) yakni mengambil sebanyak satu ose isolat bakteri dan diinokulasikan pada media car gelatin kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 29°C. Uji positif ditandai dengan media cair tetap mencair apabila di dalam suhu dingin kulkas selama beberapa menit. Akan tetapi, uji negatif ditandai dengan media gelatin yang membentuk gel apabila di dalam suhu kulkas.

- **Uji TSIA**

Adapun prosedur pengujian TSIA adalah sebagai berikut. Pertama-tama disiapkan media TSIA. Diambil isolat bakteri dengan jarum ose steril dari media

TSA dan diinokulasi pada media TSIA dengan teknik *butt* (tusuk) terlebih dahulu lalu dilanjutkan dengan teknik *slant* (gores). Kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu 30^{o}C selama 24 jam dan diamati perubahan warna. Adapun diagram alir uji TSIA bakteri *Aeromonas hydrophila* disajikan pada Lampiran 9. Berdasarkan KIPM (2018), pembacaan hasil pengujian pada media TSIA adalah sebagai berikut:

- Pembacaan A/A, jika media bagian *slant* (miring) dan *butt* (tegak) berwarna kuning (terjadi reaksi asam).
- Pembacaan A/K, jika media bagian *slant* (miring) berwarna kuning (terjadi reaksi asam) dan *butt* (tegak) tetap berwarna merah orange (terjadi reaksi basa), begitupula sebaliknya.
- Pembacaan K/K, jika media bagian *slant* (miring) dan *butt* (tegak) tetap berwarna merah orange (terjadi reaksi basa).
- Adanya H_2S ditandai dengan adanya endapan warna hitam pada media.
- Adanya reaksi gas ditandai dengan media yang pecah-pecah atau terangkat ke atas.

Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) bertujuan untuk membedakan jenis bakteri berdasarkan kemampuan memecahkan dekstrosa, laktosa, sukrosa dan pembebasan sulfida, selain itu uji TSIA berfungsi untuk mengetahui apakah bakteri tersebut menghasilkan gas, H_2S atau tidak. Media yang digunakan mempunyai dua bagian, yaitu *slant* (miring) dan *butt* (tusuk) (Kismiyati, *et a*l., 2009). Uji TSIA dilakukan dengan menusuk ose sampai sepertiga dasar tabung kemudian baru diangkat dan digores secara zig-zag pada permukaannya (Antriana, 2016).

- **Uji Hemolisin**

Uji hemolisin dilakukan dengan metode gores, yakni mengambil satu ose biakan bakteri dari media TSA dengan ose steril dan diinokulasikan pada media agar darah dengan goresan kuadran. Kemudian media agar darah diinkubasikan selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 30°C. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap perubahan warna yang terjadi pada goresan. Uji agar darah dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam melakukan hemolisis, yaitu memakai darah sebagai sumber nutrisi pertumbuhannya. Adapun diagram alir uji hemolisin bakteri *Aeromonas hydrophila* disajikan pada Lampiran 10.

Sampel ditanam pada agar darah untuk pengujian α-hemolisin dan β-hemolisin dengan cara inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Biakan strain bakteri sebanyak satu ose didepositkan pada permukaan media agar darah dengan menggoreskan dari satu sisi plat ke sisi lainnya membentuk garis lurus (Lindawati dan Suardana, 2016). Zona atau halo yang terbentuk pada media agar dari inokulat akan menandakan warna kuning-bening setelah inkubasi 96 jam yang menandakan inokulat dapat melisiskan sel-sel darah merah dalam waktu yang lama untuk hemolisis sempurna. Apabila warna hijau yang terbentuk menunjukkan α-hemolisis atau hemolisis terjadi tidak sempurna (Mangunwardoyo, *et al*., 2009).

3.5.9 Uji Kepadatan *Aeromonas hydrophila*

Sebelum dilakukan penginfeksian, dilakukan uji kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada media padat NA sebagai N_2. Bakteri *Aeromonas hydrophila* ditanam pada media NA dengan metode *pour plate*. *Aeromonas hydrophila* ditanam mulai dari pengenceran 10^8—10^{12} secara duplo. Hal ini sesuai dengan pernyataan Castro, *et al*. (2011) bahwa standar *Lethal Concentration* 50 (LC_{50}) *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele (*Clarias* sp.) ialah pada kepadatan

10^8. Sampel berupa bakteri *Aeromonas hydrophila* dari hasil peremajaan diencerkan ke dalam 12 tabung reaksi berisi Na-Fis kemudian diambil sebanyak 1 ml dari 10^8—10^{12} ke dalam cawan petri selanjutnya dituang media NA (*pour plate*). Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Selanjutnya dihitung jumlah koloni yang terbentuk dan dimasukkan ke dalam rumus perhitungan koloni sebagai berikut:

$$\mathrm{N} = \frac{\Sigma \mathrm{C}}{\{(1 \times n1) + (0{,}1 \times n2)\} \times d}$$

Keterangan:
N : Jumlah koloni (koloni/g)
ΣC : Jumlah koloni yang dihitung
n1 : Jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dapat dihitung
n2 : Jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dapat dihitung
d : Pengenceran pertama yang dilakukan.

Adapun diagram alir uji kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila* disajikan pada Lampiran 11 dan hasil perhitungan total N seperti pada Lampiran 14.

3.5.10 Penentuan Dosis Infeksi

Selanjutnya setelah mendapatkan hasil perhitungan kepadatan bakteri, maka N_1 dan N_2 dimasukkan ke dalam persamaan berikut:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

Keterangan:
N_1 : jumlah kepadatan bakteri standar pada media NA (koloni/g)
V_1 : volume akuarium (ml)
N_2 : jumlah kepadatan bakteri pada media NA (koloni/g)
V_2 : volume yang diinfeksikan (ml).

3.6 Penelitian Utama

Setelah didapatkan volume biakan yang akan diinfeksikan, maka dilakukan perendaman dalam akuarium. Setelah dilakukan pemeliharaan selama 7 hari, daging ikan lele (*Clarias* sp.) diambil untuk kemudian diberi perlakuan garam dengan konsentrasi berbeda, yakni 0%, 5%, 10%, dan 15%. Perlakuan penggaraman juga diberikan pada daging ikan lele (*Clarias* sp.) yang tidak melalui proses infeksi *Aeromonas hydrophila*. Setelah itu, maka daging diuji kepadatan bakteri, kadar garam, kadar lemak, angka peroksida, dan profil asam lemaknya.

3.6.1 Infeksi *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele (*Clarias* sp.) dan Perlakuan Garam

Proses infeksi dilakukan melalui perendaman pada akuarium ikan lele (*Clarias* sp.). Akuarium dengan ukuran 40×60 cm diisi sebanyak 50 liter air dengan populasi ikan lele sebanyak 5 ekor tiap akuarium. Ikan lele (*Clarias* sp.) yang digunakan sebagai sampel merupakan ikan lele dengan ukuran berat 80 gram/ekor dan panjang dari kepala hingga ekor sebesar ± 25 cm. Ikan lele diambil dari pembudidaya di daerah Arjosari dan diaklimatisasikan terlebih dahulu sebelum masuk ke dalam akuarium untuk pemeliharaan. Aklimatisasi dilakukan selama 1 hari agar ikan lele dapat beradaptasi pada lingkungan baru dengan baik. Sebelum dilakukan infeksi, akuarium dibersihkan dari berbagai kontaminan dan bahan organik yang mengganggu keberhasilan penelitian dengan cara direndam menggunakan larutan klorin. Setelah itu, akuarium dikuras kembali dengan air untuk menghilangkan sisa-sisa klorin. Proses pemeliharaan dilakukan selama 7 hari dengan pemberian makan sebanyak 3 kali sehari sesuai perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Jumlah Pakan} = \Sigma\text{populasi} \times \text{berat per ekor} \times 5\%$$

Sehingga, didapatkan jumlah pemberian pakan sebanyak 20 gram per hari dibagi menjadi 3, yakni 5 gram di pagi hari, 5 gram di siang hari, dan 10 gram di malam hari. Hal ini dikarenakan ikan lele lebih aktif pada malam hari. Pakan yang diberikan merupakan pakan lele merk CP 781-2. Selanjutnya, sebelum penginfeksian, dihitung volume bakteri yang akan diinfeksi melalui rumus $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$ yang telah dihitung. Volume bakteri *Aeromonas hydrophila* dalam media TSB yang telah didapatkan kemudian dimasukkan ke dalam akuarium yang berisi ikan lele dan dilakukan pemeliharaan selama 7 hari. Media TSB yang digunakan ialah media yang telah melalui proses inkubasi selama 24 jam. Selama proses pemeliharaan, tidak dilakukan adanya pembuangan sisa hasil metabolit berupa feses, akan tetapi dijaga ketersediaan oksigen dengan melakukan aerasi menggunakan aerator. Hasil analisis beberapa data yang telah dilakukan oleh Haditomo, *et al.* (2014), menyatakan bahwa terdapat kondisi kritis ikan uji akibat pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* pada hari ke-4 hingga ke-6 pemeliharaan dengan kepadatan bakteri pada media budidaya yakni 10^5—10^8 koloni/g dan mencapai titik puncak pada hari ke-8 dengan kepadatan bakteri $5x10^8$ koloni/g dengan kematian sebanyak 3 ekor ikan uji. Dalam penelitian ini dijelaskan juga bahwa *Aeromonas hydrophila* selalu ada dalam perairan dan pertumbuhannya semakin pesat dengan adanya penambahan pakan.

Pada hari ke-7 pemeliharaan, ikan lele dipanen untuk kemudian diambil dagingnya dan dihaluskan menggunakan mortal dan alu. Proses ini dilakukan dalam keadaan steril di dekat api bunsen dan menggunakan sarung tangan serta masker. Setelah didapatkan daging, dilakukan pencampuran garam merk Indomaret dengan konsentrasi yakni 0%, 5%, 10%, dan 15%. Daging yang sudah diberi garam kemudian didistribusikan dalam plastik klip untuk dilakukan pengujian berupa TPC, kadar garam, kadar lemak, angka peroksida, dan profil asam lemak.

Adapun diagram alir infeksi *Aeromonas hydrophila* dan perlakuan penambahan garam pada ikan lele (*Clarias* sp.) disajikan pada Lampiran 12.

3.6.2 Uji *Total Plate Count* (TPC)

Daging yang telah didistribusikan diambil untuk kemudian diuji kepadatan bakterinya menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Sampel yang digunakan ialah sampel daging setelah 7 hari pemeliharaan, yakni sampel daging tanpa infeksi sebagai kontrol dan sampel daging yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Masing-masing diberi perlakuan garam dengan konsentrasi 0%, 5%, 10%, dan 15%. Kemudian dilakukan uji TPC menggunakan media non-selektif yaitu NA (*Nutrient* Agar) dan selektif *Aeromonas hydrophila* yaitu RS-*medium.* Pengujian TPC menurut Yunita, *et al.* (2015) dimaksudkan untuk menunjukkan jumlah mikroba yang terdapat dalam makanan dengan cara menghitung total koloni pada media agar.

Sampel daging terinfeksi *Aeromonas hydrophila* pada garam dengan konsentrasi 0%, 5%, 10% dan 15% masing-masing diambil sebanyak 1 gram kemudian diencerkan kepadatannya menggunakan larutan Na-Fis masing-masing konsentrasi hingga 10^{-25}, 10^{-14}, 10^{-10}, dan 10^{-8}. Pengambilan pengenceran hingga pengenceran 10^{-25} pada konsentrasi 0% disebabkan oleh pendugaan bahwa terdapat pertumbuhan eksponensial sesudah proses infeksi dan mengalami penurunan seiring konsentrasi garam yang meningkat. Sedangkan sampel daging yang tidak terinfeksi *Aeromonas hydrophila* pada garam dengan konsentrasi 0%, 5%, 10% dan 15% masing-masing diambil sebanyak 1 gram kemudian diencerkan kepadatannya menggunakan larutan Na-Fis masing-masing konsentrasi hingga 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-6}, dan 10^{-4}. Setelah dilakukan pengenceran, kemudian diambil sebanyak 1 ml menggunakan mikropopet dari 4 pengenceran terakhir dan diletakkan dalam cawan petri steril (*pour plate*). Selanjutnya dilakukan penuangan

media NA yang sudah hangat di atas sampel yang sudah dituang. Pada media selektif dilakukan hal yang sama, yakni menuang 1 ml sampel ke dalam cawan petri kemudian RS-*medium* dituang di atas sampel. Selanjutnya cawan diberi label dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Seluruh proses di atas dilakukan dalam *Laminary Air Flow* (LAF) dan dalam keadaan steril. Adapun diagram alir uji TPC disajikan pada Lampiran 13.

3.6.3 Uji Kadar Garam

Sampel daging yang telah didapat, diuji kadar garamnya menggunakan titrasi argentometri. Titrasi argentometri merupakan metode titrasi untuk menentukan kadar zat dalam suatu larutan yang dilakukan dengan pembentukan endapan ion Ag^+. Pada metode Mohr, prinsip titrasi argentometri ialah melakukan titrasi pada ion klorida pada NaCl dengan menggunakan larutan $AgNO_3$ dan larutan K_2CrO_4 sebagai larutan indikator (Yusmita, 2012).

Metode titrasi argentometri menurut Salosa (2013) menggunakan sampel sebanyak 5 gram lalu dihaluskan menggunakan mortal dan alu. Kemudian dilakukan ekstraksi NaCl menggunakan aquades panas dalam suhu 100°C sebanyak 15 ml selama 15 menit hingga larut sempurna. Ekstraksi dilakukan berulang selama 8 kali. Hasil ekstraksi ditampung dalam wadah lalu ditambah dengan kalium khromat 5% sebanyak 3 ml kemudian dititrasi dengan $AgNO_3$ 0,1N hingga berubah warna menjadi merah bata. Kemudian dihitung menggunakan rumus:

$$\%\text{NaCl} = \frac{[(\text{ml AgNO3 x N AgNO3 x 58,46})]}{(\text{gram bahan x 1000})} \text{ x } 100\%$$

Prinsip titrasi argentometri menurut Yusmita (2012) yakni larutan $AgNO_3$ dan aquades pada awalnya tidak berwarna, akuades ditambahkan untuk menjaga pH larutan tetap netral. Setelah ditambahkan K_2CrO_4 larutan berubah warna

menjadi kekuningan. Kemudian NaCl akan bereaksi dengan $AgNO_3$ ketika titrasi dan membentuk endapan berwarna putih yang merupakan AgCl. Setelah semua kandungan NaCl bereaksi sempurna dengan $AgNO_3$ maka $AgNO_3$ bereaksi dengan indikator K membentuk endapan berwarna merah keruh yang merupakan Ag_2CrO_4. Setelah semua ion Cl^- bereaksi sempurna, maka kelebihan $AgNO_3$ akan bereaksi dengan ion kromat membentuk endapan perak kromat yang berwarna merah. Adapun diagram alir uji kadar garam disajikan pada Lampiran 15.

3.6.4 Uji Kadar Lemak

Berdasarkan metode analisis kadar lemak SNI 01-2354.3-2006, metode uji kadar lemak ialah sebagai berikut. Labu alas bulat kosong ditimbang sebagai berat A (gram). Kemudian sampel sebanyak 2 gram (B gram) dihaluskan menggunakan mortal dan alu. Sampel tersebut dibungkus menggunakan kertas saring bebas lemak kemudian dimasukkan dalam selongsong lemak. Selanjutnya masukkan berturut-turut 150 ml kloroform ke dalam labu alas bulat, selongsong lemak ke dalam *extractor soxhlet*, dan rangkaian *soxhlet* dipasang dengan benar. Lalu lakukan ekstraksi selama 8 jam pada suhu 60°C. Setelah selesai, untuk memisahkan pelarut dan lemak dilakukan penguapan, lalu labu lemak dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C selama ±2 jam untuk menghilangkan kloroform dan sisa air. Selanjutnya labu dan lemak didinginkan di dalam desikator selama 30 menit. Kemudian timbang berat labu alas bulat yang berisi lemak sebagai berat C (gram) sampai bobot konstan. Berat residu dalam labu lemak dinyatakan sebagai berat lemak dan dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Kadar Lemak (\%)} = \frac{(\text{C} - \text{A})}{\text{B}} \times 100\%$$

Keterangan :
A : Berat labu alas bulat kosong (gram)
B : Berat contoh (gram)
C : Berat labu alas bulat dan lemak hasil ekstraksi (g)

Ekstraksi dengan pelarut merupakan proses pemisahan senyawa berdasarkan sifat distribusinya dalam dua pelarut yang tidak saling melarut sehingga dapat dipisahkan secara selektif berdasarkan perbedaan kelarutan senyawa. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi diantaranya perbedaan metode, suhu, pelarut, serta waktu ekstraksi. Faktor-faktor tersebut akan mempengaruhi rendemen dan kualitas hasil ekstraksi. Pelarut yang umumnya digunakan dalam proses ekstraksi lemak ialah n-heksan, dietil eter, kloroform, dan benzena (Sahriawati dan Daud, 2016). Adapun diagram alir uji kadar lemak disajikan pada Lampiran 16.

3.6.5 Uji Angka Peroksida

Sebelum dilakukan uji angka peroksida, sampel terlebih dahulu diekstrak untuk mendapatkan lemak ikan lele (*Clarias* sp.). Metode ekstraksi mengikuti metode Folch dalam Aminullah, *et al.* (2018), yakni sebagai berikut. Sampel sebanyak 5 gram ditimbang dan ditambahkan pelarut kloroform:metanol (2:1) hingga volume 100 ml. Kemudian dihomogenkan menggunakan *stirer* kecepatan 300 rpm selama 15—20 menit pada suhu ruang. Selanjutnya campuran tersebut disaring menggunakan corong Buchner dengan bantuan penyaring vakum. Lalu filtrat ditambahkan NaCl 0,88% sebanyak 20 ml dan dihomogenkan selama 1 menit hingga terbentuk dua *layer*. *Layer* yang berada di bawah atau fase kloroform yang mengandung lipid dievaporasi.

Bilangan peroksida ditentukan berdasarkan SNI nomor 01 3741 tahun 2013 (Suratno dan Utomo, 2018) yaitu menggunakan metode titrasi iodometri. Prosedurnya ialah sebagai berikut. Sampel ditimbang sebanyak 5 gram dan diletakkan dalam erlenmeyer. Kemudian pelarut kloroform:asam asetat glasial (3:2) sebanyak 50 ml ditambahkan dan dihomogenkan. Setelah larutan homogen, ditambahkan larutan kalium iodida jenuh sebanyak 0,5 ml menggunakan pipet tetes dan dihomogenkan dengan cara digojog selama 1 menit. Kemudian ditambahkan sebanyak 30 ml aquades dan segera ditutup. Selanjutnya dititrasi dengan larutan $Na_2S_2O_3$ (natrium thiosulfat) 0,1 N hingga warna kuning. Kemudian ditambahkan indikator kanji 0,5 ml dan dilanjutkan titrasi sambil dikocok kuat untuk melepaskan iod dari lapisan pelarut hingga warna biru hampir hilang. Bilangan peroksida kemudian dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Bilangan peroksida (mek O2/kg)} = \frac{1000 \times \text{N} \times (\text{V0} - \text{V1})}{\text{W}}$$

Keterangan:
N : normalitas larutan standar $Na_2S_2O_3$
V_0 : volume larutan $Na_2S_2O_3$ yang diperlukan pada penitrasian sampel (ml)
V_1 : volume larutan $Na_2S_2O_3$ yang diperlukan dalam penitrasian blanko (ml)
W : bobot sampel (gram)

Prinsip pengukuran peroksida dengan metode titrasi didasarkan pada pengukuran sejumlah iod yang dibebaskan pada kalium iodida melalui reaksi oksidasi oleh peroksida dalam minyak pada suhu ruang (Pangestuti dan Rohmawati, 2018). Tujuan perhitungan angka peroksida ialah sebagai parameter untuk menentukan tingkat kerusakan minyak yang teroksidasi. Bilangan peroksida sangat penting untuk menentukan derajat kerusakan minyak, dimana *Free Fatty Acid* (FFA) dapat mengikat oksigen pada ikatan rangkapnya sehingga membentuk peroksida (Nainggolan, *et al*., 2016). Adapun diagram alir uji angka peroksida disajikan pada Lampiran 17.

3.6.6 Uji Profil Asam Lemak

Uji profil asam lemak dilakukan melalui tiga tahap, yakni preparasi, hidrolisis lemak, dan transesterifikasi. Preparasi dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut petroleum eter. Sampel sebanyak 25 gram ditambah dengan pelarut petroleum eter dengan volume 25 ml kemudian dihomogenkan agar meresap sempurna. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan menggunakan *shaker* selama 5 jam. Setelah 5 jam maka filtrat diambil kemudian ditampung pada wadah erlenmeyer dan ditutup alumunium foil agar tidak ada kontak dengan udara maupun cahaya. Residu ditambah kembali dengan pelarut petroleum eter sebanyak 25 ml dan dilakukan penghomogenan kembali selama 5 jam dengan *shaker.* Filtrat diambil kembali dan ditampung dalam erlenmeyer. Homogenisasi ini dilakukan sebanyak 3 kali pergantian pelarut. Hal ini sesuai dengan pernyataan Soetjipto (2018) bahwa metode maserasi digunakan pelarut yakni n-heksan atau petroleum eter pada suhu ruang selama 24 jam. Kemudian maserasi kembali hingga 2 kali.

Proses selanjutnya yakni penentuan komposisi asam lemak dilakukan di alat GC-MS merk RTX-1MS di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH-UB). Spesifikasi alat GC-MS di LSIH-UB disajikan pada Tabel 5 berikut:

Tabel 5. Spesifikasi alat GC-MS

Instrumen : GC-MS merk RTX-1MS	
[GC-2010]	
Suhu Kolom	: 80,0 °C
Suhu Injeksi	: 310,0 °C
Mode Injeksi	: *Split*
Mode Kontrol Aliran	: *Linear Velocity*
Tekanan	: 10,9 kPa
Aliran Total	: 72,5 mL/menit
Aliran Kolom	: 0,45 mL/menit
Aliran Linear	: 24,8 cm/detik
Aliran Pembersihan	: 3,0 mL/menit
[MS Table]	
Start Time	: 1,00 *min*
End Time	: 52,00 *min*
ACQ Mode	: *Scan*
Event Time	: 1666
Scan Speed	: 20,00
Start m/z	: 500,00

Sumber: Data Primer, 2019.

Hidrolisis lemak dilakukan dengan metode sebagai berikut. Sebanyak 1 ml sampel ditambahkan KOH sebanyak 1 ml (1:1) kemudian di oven selama 1 jam pada suhu 90°C. Selanjutnya ditambahkan larutan HCl 6N sebanyak 0,2 ml, akuades sebanyak 1 ml, dan n-heksan sebanyak 1 ml. Setelah terbentuk 2 fraksi, maka diambil fraksi n-heksan dan filtrat diuapkan dengan nitrogen. Proses selanjutnya yakni transesterifikasi dilakukan dengan menambahkan BF_3 10% dalam metanol sebanyak 1 ml. Kemudian di oven selama 20 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambahkan akuades 1 ml dan n-heksan 1 ml hingga terbentuk 2 fraksi. Fraksi n-heksan diambil untuk selanjutnya dilakukan injeksi ke instrumen GC-MS.

Pada dasarnya, kromatogram asam lemak bebas sukar dideteksi disebabkan asam lemak rantai panjang dan tahap intraksi dengan kolom kapiler. Untuk mempermudah analisis menggunakan alat GC-MS, maka dilakukan esterifikasi terlebih dahulu. Senyawa seperti asam lemak yang tidak stabil secara termal dan tidak mudah menguap dapat diidentifikasi menggunakan GC-MS

dengan cara mengubah asam lemak menjadi turunan-turunannya yang lebih mudah menguap dan stabil, salah satunya yaitu dengan merubah menjadi metil ester (Manduapessy, 2017). Menurut Wibawa, *et al.* (2006), asam lemak dan gliserida penyusunnya diubah terlebih dahulu menjadi bentuk metil esternya menggunakan metanol dan Boron Trifluorida (BF_3) sebagai katalis. Bentuk metil esternya ini yang kemudian diinjeksikan pada GC-MS. Ningtyas, *et al.* (2013) menambahkan bahwa proses transesterifikasi merupakan reaksi trigliserida dalam minyak nabati atau hewani dengan media alkohol dan katalis basa/asam yang kemudian menghasilkan asam lemak yang memiliki rantai pendek dan gliserol. Proses transesterifikasi disebut juga reaksi alkoholis dari ester karena reaksi tersebut disertai dengan pertukaran bagian alkohol dari suatu ester. Jusman, *et al.* (2018) menambahkan aspek yang berpengaruh pada proses transesterifikasi ialah jenis dan konsentrasi katalis (asam atau basa), rasio molar alkohol atau minyak, suhu, dan pengadukan. Adapun diagram alir uji profil asam lemak disajikan pada Lampiran 18.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Biokimia *Aeromonas hydrophila*

Uji biokimia pada bakteri *Aeromonas hydrophila* dilakukan pada media TSIA, gelatin, dan *blood agar* serta pengujian pewarnaan gram. Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan, didapatkan hasil uji biokimia yang disajikan pada Tabel 6 berikut.

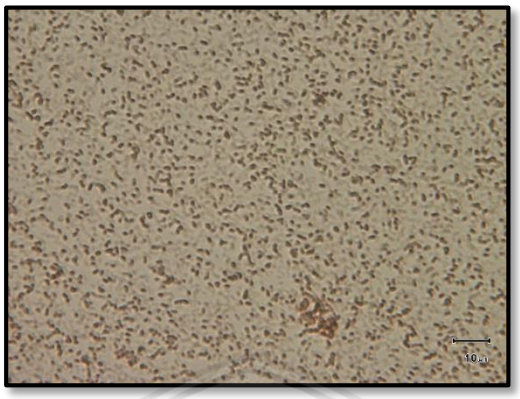
Tabel 6. Hasil uji biokimia

Parameter Uji	Acuan Menurut Austin (2007) dan Cowan (2003)	Hasil Uji Sampel Bakteri
Pewarnaan Gram	Gram negatif	Gram negatif
Bentuk	Basil	Basil
TSIA	A/K	A/K
Produksi Gas	+	+
Gelatin	+	+
Agar Darah	ND	+

Keterangan: ND (Tidak ada data)

Berdasarkan hasil uji biokimia, didapatkan hasil pewarnaan gram yakni berwarna merah dan berbentuk batang ketika dilihat di bawah mikroskop. Selain itu, bakteri ini tumbuh optimal membentuk koloni mengikuti garis pada agar miring di media TSA dengan suhu inkubasi 30°C selama 24 jam. Haditomo, *et al.* (2013) mengatakan bahwa *Aeromonas hydrophila* mencapai pertumbuhan tingkat tertinggi pada suhu 28°C dan dapat hidup pada rentang suhu 4 hingga 37°C. Pernyataan Sardiani, *et al.* (2015) yang mengatakan bahwa bakteri gram negatif tidak bisa mempertahankan warna kristal ungu dan terwarnai oleh pewarna sekunder berupa safranin sehingga berwarna merah saat diamati di bawah mikroskop. Bakteri gram negatif tidak dapat mempertahankan warna primer dikarenakan dinding selnya hanya mengandung sedikit peptidoglikan dan banyak

lipid sehingga akan turut serta larut dalam alkohol 70% pada saat pembilasan. Hasil pewarnaan gram dapat dilihat pada Gambar 5.

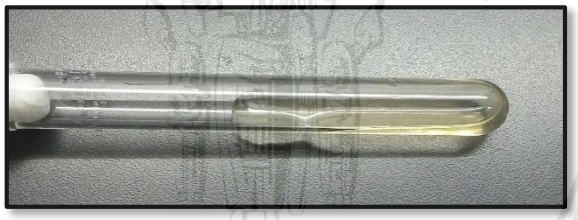


Gambar 5. Hasil pewarnaan gram *A. hydrophila* dengan perbesaran 100X (Data Primer, 2019)

Pada uji TSIA, didapatkan hasil bahwa pada sampel menunjukkan reaksi *acid* (A) / *alkaline* (K) yang ditandai dengan perubahan warna media bagian *slant* (miring) dari merah orange menjadi kuning dan terdapat warna hitam pada agar yang menunjukkan adanya produksi H_2S. Menurut Anggraeni (2016), adanya warna kuning pada bagian *slant* media TSIA menunjukkan bakteri-bakteri ini melakukan fermentasi terhadap glukosa, laktosa, dan sukrosa. Bakteri memiliki kemampuan dalam mendegradasi dan memfermentasi karbohidrat yang disertai produksi asam. Bakteri yang memproduksi H_2S memiliki kemampuan dalam mereduksi asam-asam amino yang mengandung sulfur. Mikroorganisme yang menghasilkan desulfurase akan menghasilkan senyawa FeS yang berwarna hitam. TSIA agar mengadung laktosa dan sukrosa dalam konsentrasi 1%, glukosa 0,1% dan *phenol red* sebagai indikator yang menyebabkan perubahan warna dari merah orange menjadi kuning dalam suasana asam. Adapun hasil uji TSIA disajikan pada Gambar 6.

Gambar 6. Hasil uji TSIA *Aeromonas hydrophila*
(Data Primer, 2019)

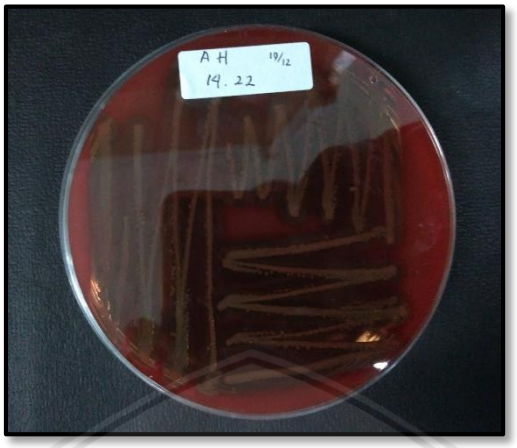
Pada media gelatin, didapatkan hasil bahwa pada sampel bakteri tetap cair. Media tetap cair maka disebut gelatin positif. Sedangkan apabila media menjadi beku, maka disebut sebagai gelatin negatif. Hal ini berarti bakteri tidak mempunyai kemampuan menguraikan gelatin. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Huda, *et al*. (2012), bahwa media gelatin akan tetap cair apabila isolat bakteri yang diuji memiliki enzim gelatinase. Media tetap cair maka disebut gelatin positif. Adapun hasil uji gelatin disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil uji gelatin *Aeromonas hydrophila*
(Data Primer, 2019)

Sedangkan pada uji hemolisis dengan media darah didapatkan hasil bahwa bakteri mampu membentuk zona halo berwarna bening kekuningan yang berarti bahwa sampel bakteri mempunyai kemampuan melisiskan sel darah. Hemolisis yang terjadi merupakan hemolisis β yakni menunjukkan warna kuning-bening dan terjadi hemolisis sempurna. Hemolisin menurut Mangunwardoyo, *et al.* (2009) merupakan protein yang mampu merusak membran sel darah merah sekaligus melisiskan sel darah merah. Penentuan tingkat virulensi bakteri didapatkan dari

kemampuan bakteri menghasilkan toksin ekstraseluler berupa hemolisin. Adapun hasil uji hemolisis disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Hasil uji hemolisis *Aeromonas hydrophila*
(Data Primer, 2019)

4.2 Uji Kepadatan *Aeromonas hydrophila*

Berdasarkan hasil uji kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada media padat (NA) didapatkan hasil sebagai berikut. Hasil jumlah koloni menggunakan metode TPC disajikan pada Tabel 7. Untuk perhitungan jumlah koloni (koloni/g) disajikan pada Lampiran 14.

Tabel 7. Kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada media NA

Pengenceran	Jumlah Koloni	
	A	B
10^{-8}	247	220
10^{-9}	190	183
10^{-10}	85	76
10^{-11}	45	50
10^{-12}	3	2

Sumber: Data Primer, 2019.

4.3 Dosis Infeksi *Aeromonas hydrophila*

Diketahui kepadatan standar bakteri *Aeromonas hydrophila* ialah 10^8 (Castro, *et al.,* 2011) dan kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada media NA yang telah dihitung ialah 10^{11}. Sedangkan volume air dalam akuarium ialah 50 liter. Oleh karena itu, volume yang diinfeksikan ke dalam kolam ialah sebanyak 50 ml dengan perhitungan sebagai berikut:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$50.000 \times 10^8 = V_2 \times 10^{11}$$

$$50 \text{ ml} = V_2$$

Maka sebanyak 50 ml media TSB yang sudah ditanam dengan *Aeromonas hydrophila* selama 24 jam selanjutnya direndam ke dalam 1 akuarium.

4.4 Hasil Uji *Total Plate Count* (TPC)

Prinsip perhitungan metode TPC dilakukan dengan menghitung koloni-koloni yang terbentuk pada media dengan *range* statistik dari 25 hingga 250 koloni (SNI 2332.3: 2015). Koloni-koloni ini dapat dilihat secara kasat mata tanpa bantuan mikroskop. Kisaran 25—250 ini digunakan sebagai standar dalam menentukan seluruh faktor yang mempengaruhi hasil akhir (Yunita, *et al.*, 2015). Berdasarkan uji *Total Plate Count* (TPC) sampel daging ikan lele didapatkan hasil nilai log TPC pada media NA dari konsentrasi garam 0% hingga 15% yakni 9,93—4,61 ($8{,}5\times10^9$—$4{,}1\times10^4$ koloni/g) pada kondisi sebelum penginfeksian *Aeromonas hydrophila* dan nilai log TPC 26,43—8,89 ($2{,}7\times10^{26}$—$7{,}8\times10^8$ koloni/g) setelah penginfeksian. Sedangkan pada media RS didapatkan nilai log TPC dari konsentrasi garam 0% hingga 15% yakni 9,17—0 ($1{,}5\times10^9$—0 koloni/g) pada kondisi sebelum penginfeksian dan nilai log TPC 25,19—8,86 ($1{,}6\times10^{25}$—$7{,}2\times10^8$ koloni/g) setelah penginfeksian. Hasil uji TPC pada media non-selektif (NA)

disajikan pada Tabel 8. Sedangkan hasil uji TPC pada media selektif (RS-*medium*) disajikan pada Tabel 9.

Tabel 8. Hasil uji TPC pada media non-selektif (NA)

Perlakuan	Ulangan			Rata-rata	Log Rata-rata	Stdev
	1	2	3			
K 0%	$8,7\times10^{9}$	$8,5\times10^{9}$	$8,3\times10^{9}$	$8,5\times10^{9}$	9.93	0.01
K 5%	$5,2\times10^{8}$	$5,7\times10^{8}$	$5,5\times10^{8}$	$5,5\times10^{8}$	8.74	0.02
K 10%	$4,5\times10^{6}$	$5,4\times10^{6}$	$5,3\times10^{6}$	$5,0\times10^{6}$	6.70	0.04
K 15%	$3,2\times10^{4}$	$4,5\times10^{4}$	$4,8\times10^{4}$	$4,1\times10^{4}$	4.61	0.09
AH 0%	$2,6\times10^{26}$	$2,7\times10^{26}$	$2,7\times10^{26}$	$2,7\times10^{26}$	26.43	0.01
AH 5%	$3,1\times10^{15}$	$3,1\times10^{15}$	$3,1\times10^{15}$	$3,1\times10^{15}$	15.49	0.00
AH 10%	$1,4\times10^{11}$	$1,3\times10^{11}$	$1,3\times10^{11}$	$1,3\times10^{11}$	11.12	0.02
AH 15%	$7,6\times10^{8}$	$8,1\times10^{8}$	$7,8\times10^{8}$	$7,8\times10^{8}$	8.89	0.01

Sumber: Data Primer, 2019.

Tabel 9. Hasil uji TPC pada media selektif (RS)

Perlakuan	Ulangan			Rata-rata	Log Rata-rata	Standar Deviasi
	1	2	3			
K 0%	$1,4\times10^{9}$	$1,4\times10^{9}$	$1,5\times10^{9}$	$1,5\times10^{9}$	9.17	0.01
K 5%	$1,1\times10^{8}$	$8,6\times10^{7}$	$1,1\times10^{8}$	$1,0\times10^{8}$	8.01	0.06
K 10%	0	0	0	0	0.00	0.00
K 15%	0	0	0	0	0.00	0.00
AH 0%	$1,9\times10^{25}$	$1,1\times10^{25}$	$1,8\times10^{25}$	$1,6\times10^{25}$	25.19	0.13
AH 5%	$1,4\times10^{15}$	$1,4\times10^{15}$	$1,4\times10^{15}$	$1,4\times10^{15}$	15.15	0.00
AH 10%	$1,2\times10^{11}$	$1,4\times10^{11}$	$1,3\times10^{11}$	$1,3\times10^{11}$	11.11	0.03
AH 15%	$7,6\times10^{8}$	$6,8\times10^{8}$	$7,2\times10^{8}$	$7,2\times10^{8}$	8.86	0.02

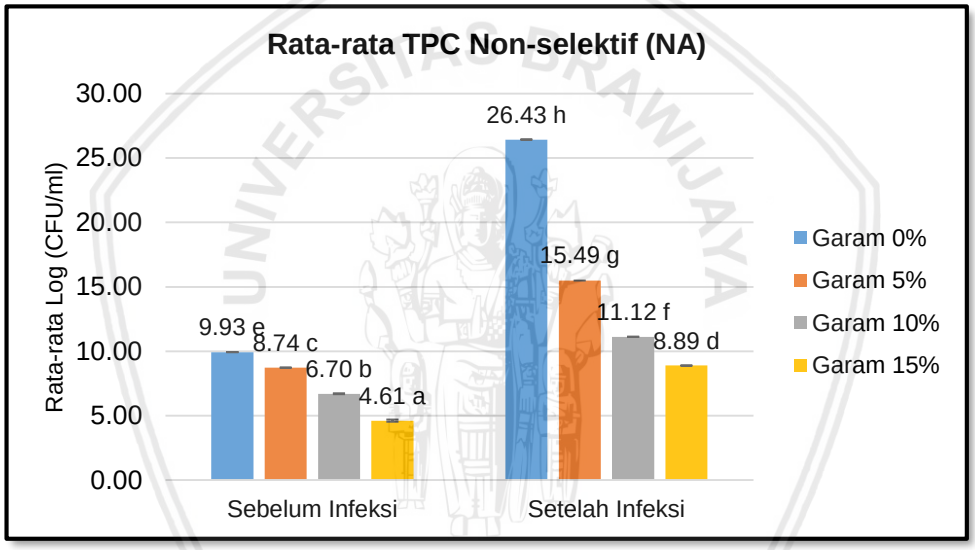
Sumber: Data Primer, 2019.

Hasil pengujian ANOVA nilai TPC non-selektif dan selektif *Aeromonas hydrophila* disajikan pada Lampiran 34 dan Lampiran 35. Dari hasil sidik ragam ANOVA, menunjukkan bahwa terdapat pengaruh nyata antara perlakuan konsentrasi garam berbeda sebelum dan sesudah infeksi terhadap nilai TPC sampel ikan lele (*Clarias* sp.). Hasil sidik ragam pada taraf 5% yakni menunjukkan

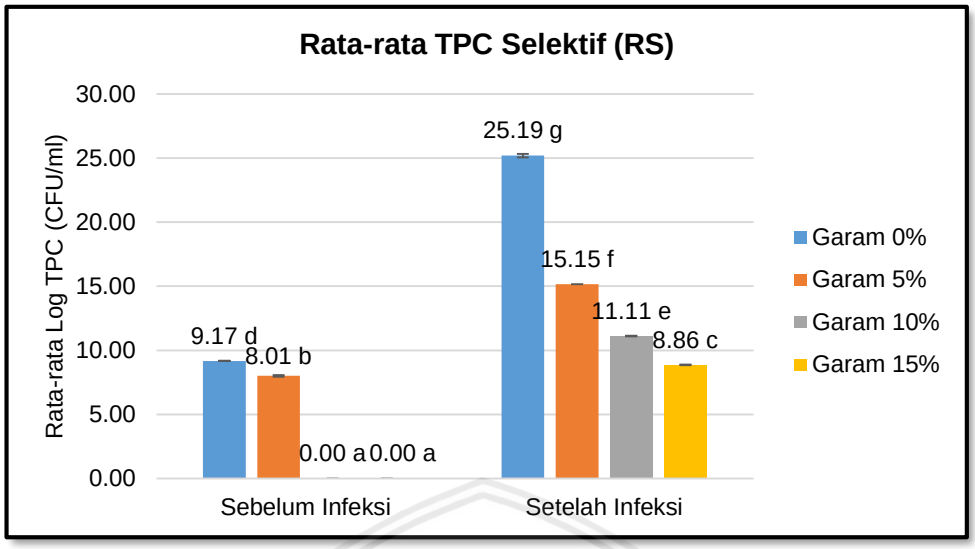
nilai *Sig.* 0,000 < 0,05 yang berarti terdapat perbedaan nyata antar perlakuan dalam penelitian terhadap nilai TPC. Sehingga dilakukan uji lanjut menggunakan Uji Duncan. Tabel Uji Duncan pada TPC non-selektif maupun selektif disajikan pada Lampiran 34 dan Lampiran 35.

4.4.1 Analisis Pengaruh Konsentrasi Garam Berbeda terhadap Nilai TPC

Hasil uji TPC berdasarkan konsentrasi garam yang berbeda disajikan pada Gambar 10 untuk TPC non-selektif dan Gambar 11 untuk TPC selektif *Aeromonas hydrophila*.



Gambar 9. Diagram rata-rata *Total Plate Count* (TPC) non-selektif
(Sumber: Data Primer, 2019)



Gambar 10. Diagram rata-rata *Total Plate Count* (TPC) selektif
(Sumber: Data Primer, 2019)

Berdasarkan Gambar 10 dan Gambar 11, secara keseluruhan nilai TPC pada daging ikan lele (*Clarias* sp.) baik pada media non-selektif maupun selektif dengan perlakuan tanpa infeksi maupun dengan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* mengalami penurunan secara signifikan seiring bertambahnya konsentrasi garam. Nilai TPC non-selektif paling rendah terdapat pada perlakuan garam 15% tanpa infeksi yakni $4{,}1\times10^{4}$ koloni/g. Sedangkan nilai TPC selektif paling rendah terdapat pada perlakuan garam 15% tanpa infeksi yakni 0 koloni/g. Berdasarkan hasil uji lanjut Duncan, pada TPC non-selektif perbedaan konsentrasi garam yang ditambahkan terdapat pengaruh nyata antar perlakuan garam. Akan tetapi, pada TPC selektif perlakuan penambahan garam konsentrasi 10% dan 15% tidak terdapat pengaruh nyata. Hal ini diduga karena pada penambahan garam konsentrasi 10% sudah mampu melisiskan bakteri *Aeromonas hydrophila* sehingga pada konsentrasi garam 15% juga sudah tidak terdeteksi adanya bakteri tersebut. Hal ini dibuktikan dengan nilai TPC yakni 0 koloni/g.

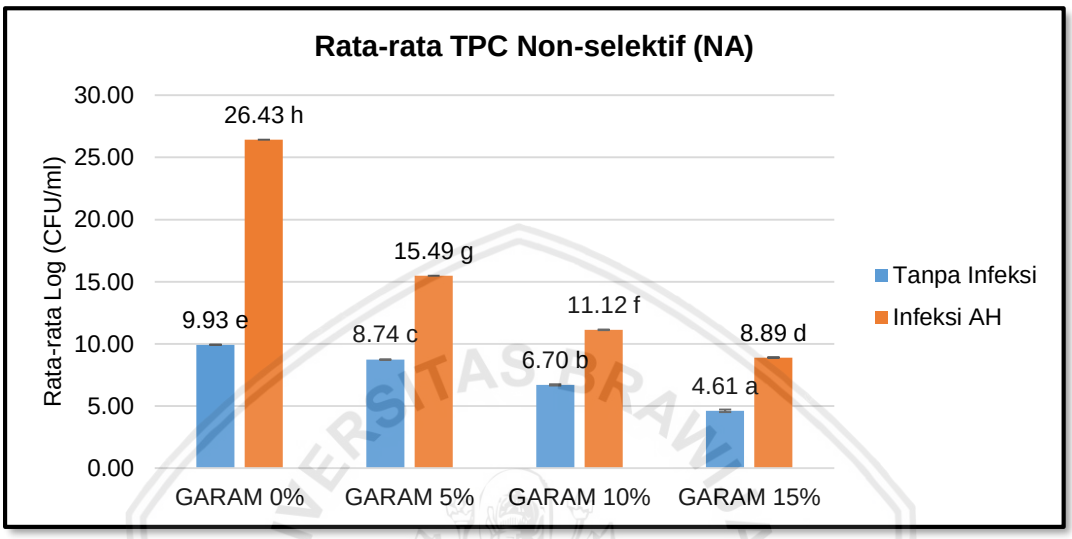
Penurunan nilai TPC seiring naiknya konsentrasi garam yang diberikan membuktikan bahwa garam dapat menurunkan nilai TPC dan bersifat bakteriosidal

terhadap bakteri yang tidak tahan terhadap kadar garam tinggi. Penurunan nilai TPC seiring naiknya konsentrasi garam yang diberikan juga membuktikan bahwa garam dapat menurunkan nilai TPC *Aeromonas hydrophila.* Garam menurut Amalia, *et al.* (2016) bersifat bakteriosid yang mampu membunuh bakteri dan bakteriostat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Kemampuan ini disebabkan oleh aktivitas osmotik garam terhadap daging ikan. Daging ikan bertindak sebagai membran semipermeabel yang mana garam akan menarik kandungan air dalam daging sehingga bakteri dalam daging akan kehilangan air dan mengalami krenasi. Garam juga bersifat sangat toksik akibat ion klor (Cl^-) yang lepas akibat proses ionisasi akan menghambat proses respirasi. Selain itu, garam akan menurunkan kadar protein dalam daging sehingga aktivitas enzimatis akan terhambat.

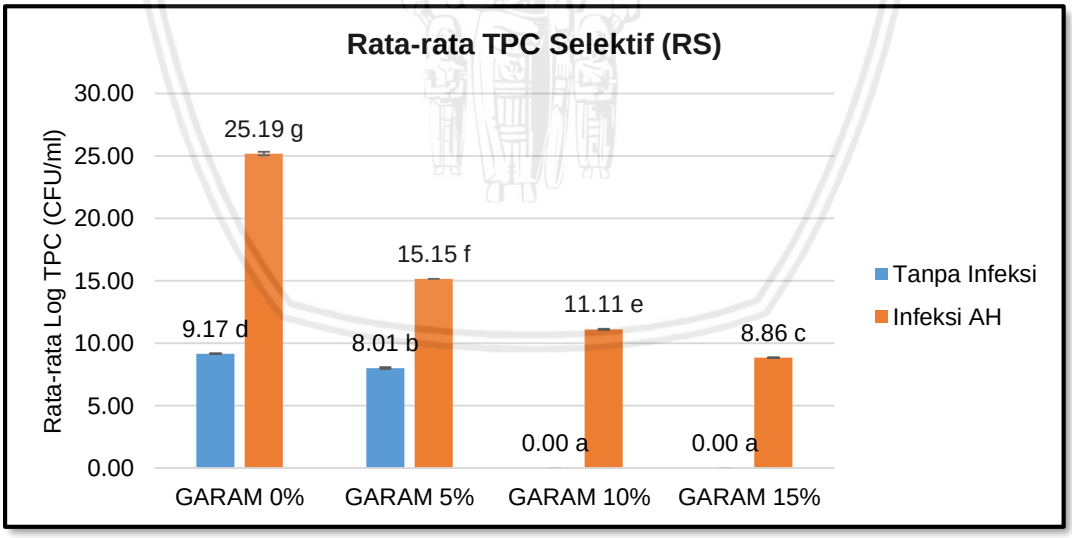
Nilai TPC pada konsentrasi garam 15% yang tetap ada, diduga akibat masih adanya bakteri halofilik yang dapat bertahan hidup pada kadar garam tinggi. Menurut Fardiaz (1988), pada kondisi aerob bakteri yang dapat tumbuh pada konsentrasi garam tinggi yakni *Micrococcus*. Berdasarkan SNI 2729 tahun 2013, batas cemaran mikroba pada daging ikan segar ialah $5{,}0 \times 10^5$ koloni/g. Sesuai dengan persyaratan ALT pada SNI, maka perlakuan penambahan garam dengan konsentrasi 15% pada daging tanpa infeksi masuk ke dalam persyaratan batas cemaran mikroba daging ikan segar.

4.4.2 Analisis Pengaruh Infeksi *Aeromonas hydrophila* terhadap Nilai TPC

Hasil uji TPC berdasarkan pengaruh infeksi *Aeromonas hydrophila* disajikan pada Gambar 12 untuk TPC non-selektif dan Gambar 13 untuk TPC selektif *Aeromonas hydrophila*.



Gambar 11. Diagram rata-rata TPC (*Total Plate Count*) non-selektif (NA)
Sumber: Data Primer, 2019.



Gambar 12. Diagram rata-rata TPC (*Total Plate Count*) selektif (RS)
Sumber: Data Primer, 2019.

Berdasarkan Gambar 12 dan Gambar 13, secara keseluruhan rata-rata nilai TPC pada daging ikan lele (*Clarias* sp.) baik pada media non-selektif maupun selektif perlakuan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* mengalami kenaikan nilai

TPC dibandingkan dengan nilai TPC pada perlakuan tanpa infeksi. Berdasarkan hasil uji lanjut Duncan, terdapat pengaruh nyata antar perlakuan penginfeksian dengan penambahan garam pada konsentrasi berbeda baik pada TPC selektif maupun TPC non-selektif. Hal ini dibuktikan dengan nilai TPC antara perlakuan tanpa infeksi maupun dengan infeksi *Aeromonas hydrophila* pada konsentrasi garam yang sama memiliki notasi yang berbeda.

Jumlah koloni secara keseluruhan dari konsentrasi garam 0% hingga 15% lebih banyak koloni bakteri yang terbentuk pada daging dengan infeksi *Aeromonas hydrophila*. Hal ini diduga akibat adanya pertumbuhan eksponensial dari bakteri *Aeromonas hydrophila* yang diinfeksikan pada hari pertama pemeliharaan ikan lele. Kolam pada pemeliharaan tidak diberi sirkulasi pergantian air, sehingga bakteri *Aeromonas hydrophila* tetap berada dalam kolam hingga hari ke-tujuh saat pemanenan dan mengalami pertumbuhan pesat akibat keadaan lingkungan yang mendukung pertumbuhan *Aeromonas hydrophila.* Kolam baik tanpa infeksi maupun dengan infeksi menjadi keruh akibat menumpuknya bahan organik hasil sisa metabolit. Akan tetapi, jumlah koloni pada media non-selektif tidak dapat menurun hingga 0 koloni/g dibandingkan pada media selektif dikarenakan pada media non-selektif bakteri halofilik masih dapat tumbuh sedangkan media RS hanya dapat dipakai sebagai media tumbuh bakteri *Aeromonas hydrophila* yang bukan merupakan bakteri tahan garam.

Fase logaritmik atau fase eksponensial diartikan sebagai fase dimana bakteri telah menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru dan memulai membelah diri hingga mencapai populasi maksimum. Pertumbuhan yang cepat terjadi pada fase ini. Periode logaritmik ini dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan yang mendukung pertumbuhan seperti aerasi, nutrisi, pH, dan suhu (Kamal, *et al.*, 2016). Selain itu, pengaruh pakan yang diberikan akan mempercepat pertumbuhan *Aeromonas hydrophila*. Haditomo, *et al.* (2014)

mengatakan bahwa ada tidaknya oksigen bukan menjadi masalah bagi *Aeromonas hydrophila* karena bersifat fakultatif anaerob. Namun penambahan pakan akan meningkatkan pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* yang mana bersifat heterotrof. Bakteri ini dapat memanfaatkan nutrisi berupa karbon dan nitrogen dari pakan, diperparah dengan kondisi ikan yang stres dan sisa metabolit dari ikan. Triyaningsih, *et al.* (2014) menambahkan, ikan lele yang terserang *Aeromonas hydrophila* akan mengeluarkan eksotoksi berupa enzim protease yang dapat menyerang pertahanan tubuh inang sehingga masuk ke dalam jaringan otot yang kaya akan protein. Kerusakan tubuh ini diawali dengan kerusakan pada sistem pertahanan tubuh paling luar yaitu kulit hingga masuk ke dalam daging dan aliran darah.

4.5 Hasil Uji Kadar Garam

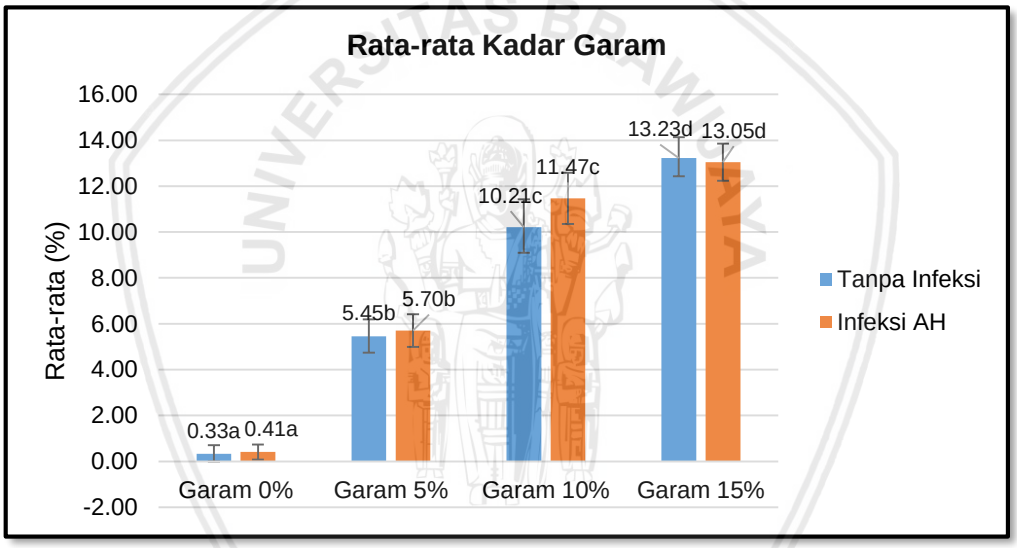
Berdasarkan hasil uji kadar garam, terdapat kenaikan secara signifikan pada perlakuan penambahan garam dari konsentrasi 0% hingga 15% baik pada perlakuan tanpa infeksi *Aeromonas hydrophila* maupun dengan infeksi *Aeromonas hydrophila*. Hasil uji kadar garam disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil uji kadar garam

Perlakuan	Ulangan			Rata-rata	Notasi	Stdev
	1	2	3			
K 0%	0,77	0,11	0,10	0,33	a	0,38
K 5%	4,63	6,05	5,68	5,45	b	0,74
K 10%	8,82	11,05	10,77	10,21	c	1,21
K 15%	12,19	13,80	13,71	13,23	d	0,90
AH 0%	0,74	0,08	0,41	0,41	a	0,33
AH 5%	4,99	6,41	5,70	5,70	b	0,71
AH 10%	10,35	12,58	11,47	11,47	c	1,12
AH 15%	12,24	13,85	13,05	13,05	d	0,81

Sumber: Data Primer, 2019.

Hasil pengujian ANOVA nilai kadar garam disajikan pada Lampiran 36. Dari hasil sidik ragam ANOVA, menunjukkan bahwa terdapat pengaruh nyata antara perlakuan konsentrasi garam berbeda sebelum dan sesudah infeksi terhadap nilai kadar garam sampel ikan lele (*Clarias* sp.). Hasil sidik ragam pada taraf 5% yakni menunjukkan nilai *Sig.* 0,000 < 0,05 yang berarti terdapat perbedaan nyata antar perlakuan dalam penelitian terhadap nilai kadar garam. Sehingga dilakukan uji lanjut menggunakan Uji Duncan. Tabel Uji Duncan pada nilai kadar garam disajikan pada Lampiran 36. Hasil uji kadar garam dalam bentuk grafik disajikan pada Gambar 14.



Gambar 13. Diagram rata-rata kadar garam
(Data Primer, 2019)

Berdasarkan hasil uji kadar garam baik pada sampel daging ikan lele (*Clarias* sp.) tanpa infeksi maupun dengan infeksi *Aeromonas hydrophila* mengalami kenaikan secara signifikan dari penambahan garam konsentrasi 0% hingga 15%. Kenaikan kadar garam terjadi pada daging tanpa infeksi yang menunjukkan nilai kadar garam dari 0,33% menjadi 13,23%. Adanya kandungan garam yang terdeteksi pada perlakuan 0% diakibatkan oleh adanya garam yang terkandung dari tubuh ikan meskipun tanpa perlakuan penambahan garam.

Sedangkan kenaikan kadar garam terjadi pada perlakuan infeksi *Aeromonas hydrophila* dari 0,41% menjadi 13,05%. Garam menurut Kaimudin (2014) bersifat higroskopis yang mampu menarik kandungan air dari dalam bahan sehingga seiring bertambahnya konsentrasi garam yang diberikan maka kadar air akan semakin turun. Kecepatan penetrasi garam ke dalam tubuh ikan dipengaruhi oleh beberapa faktor yakni konsentrasi garam dimana semakin tinggi konsentrasi garam yang diberikan maka semakin cepat proses masuknya garam ke dalam daging ikan.

Pada perbedaan konsentrasi garam yang ditambahkan terdapat pengaruh nyata antar perlakuan garam. Akan tetapi tidak terdapat pengaruh nyata antar perlakuan penginfeksian maupun tanpa penginfeksian *Aeromonas hydrophila*. Hal ini membuktikan bahwa faktor yang paling berpengaruh terhadap kenaikan kadar garam ialah konsentrasi garam yang ditambahkan pada daging ikan lele (*Clarias* sp.). Penginfeksian tidak berpengaruh terhadap kenaikan kadar garam.

Garam (NaCl) dapat berpengaruh terhadap keseimbangan (*buffer*) cairan antar sel (ekstraseluler). NaCl berpengaruh terhadap pengaturan keseimbangan pada daging sehingga membentuk sistem imun yang dapat menghambat pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* (Burhanuddin, 2001). Penggaraman mampu menarik air dari tubuh ikan akibat pengaruh tekanan osmosis. Penggunaan garam dengan kualitas yang baik dapat mempengaruhi penyerapan uap air selama masa penyimpanan. Garam kasar yang mengandung banyak kotoran akan lebih banyak menyerap uap air sehingga cepat meleleh dan tidak terpenetrasi ke dalam daging (Assadad dan Utomo, 2011).

4.6 Hasil Uji Kadar Lemak

Berdasarkan hasil uji kadar lemak, terdapat penurunan pada perlakuan penambahan garam dari konsentrasi 0% hingga 5% baik pada perlakuan tanpa infeksi *Aeromonas hydrophila* maupun dengan infeksi *Aeromonas hydrophila* dan mengalami kenaikan kadar lemak mulai dari perlakuan penambahan garam konsentrasi 5% hingga 15% baik pada perlakuan tanpa infeksi *Aeromonas hydrophila* maupun dengan infeksi *Aeromonas hydrophila*. Hasil uji kadar lemak didapatkan dari perhitungan kadar lemak *dry basis* yang disajikan pada Tabel 13.

Tabel 11. Hasil uji kadar lemak

Perlakuan	Ulangan			Rata-rata	Notasi	Stdev
	1	2	3			
K 0%	14,272	14,572	14,672	14,505	g	0,208
K 5%	5,417	5,132	5,273	5,274	b	0,143
K 10%	6,276	6,038	6,157	6,157	c	0,119
K 15%	8,778	8,989	8,886	8,884	d	0,105
AH 0%	13,351	12,702	13,348	13,133	f	0,374
AH 5%	3,868	5,020	4,334	4,408	a	0,580
AH 10%	8,993	9,893	9,274	9,387	d	0,460
AH 15%	10,507	9,617	11,419	10,515	e	0,901

Sumber: Data Primer, 2019.

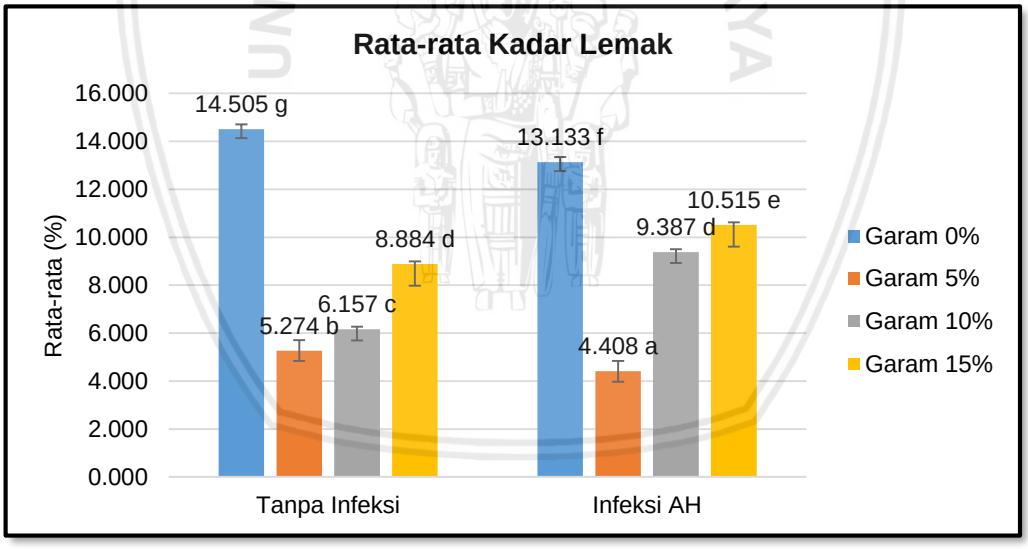
Kadar lemak yang digunakan ialah dalam bentuk *dry basis* yang sudah diolah datanya melalui *wet basis* yang didapatkan. Hal ini supaya kadar lemak tidak dipengaruhi oleh kadar air. Data *wet basis* kadar lemak disajikan pada Lampiran 32. Perhitungan kadar lemak *dry basis* menggunakan rumus sebagai berikut:

$$Dry\ basis = \frac{wet\ basis\ \text{kadar lemak}}{100 - \text{kadar air}} \times 100$$

Hasil pengujian ANOVA nilai kadar lemak disajikan pada Lampiran 37. Dari hasil sidik ragam ANOVA, menunjukkan bahwa terdapat pengaruh nyata antara perlakuan konsentrasi garam berbeda sebelum dan sesudah infeksi terhadap nilai kadar lemak sampel ikan lele (*Clarias* sp.). Hasil sidik ragam pada taraf 5% yakni menunjukkan nilai *Sig.* 0,000 < 0,05 yang berarti terdapat perbedaan nyata antar perlakuan dalam penelitian terhadap kadar lemak. Sehingga dilakukan uji lanjut menggunakan Uji Duncan. Tabel Uji Duncan kadar lemak disajikan pada Lampiran 38.

4.6.1 Analisis Pengaruh Konsentrasi Garam Berbeda terhadap Kadar Lemak

Hasil uji kadar lemak berdasarkan konsentrasi garam yang berbeda disajikan pada Gambar 15.



Gambar 14. Diagram rata-rata kadar lemak
(Data Primer, 2019)

Berdasarkan Gambar 15 pada perlakuan tanpa infeksi maupun infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* terjadi penurunan kadar lemak pada perlakuan penambahan garam 5% secara drastis dan mengalami kenaikan kembali pada penambahan garam konsentrasi 10% hingga 15%. Berdasarkan hasil uji lanjut

Duncan, pada perbedaan konsentrasi garam yang ditambahkan terdapat pengaruh nyata antar perlakuan garam. Hal ini dibuktikan dengan kadar lemak tiap penambahan konsentrasi garam memiliki notasi yang berbeda baik tanpa infeksi maupun dengan infeksi *Aeromonas hydrophila*.

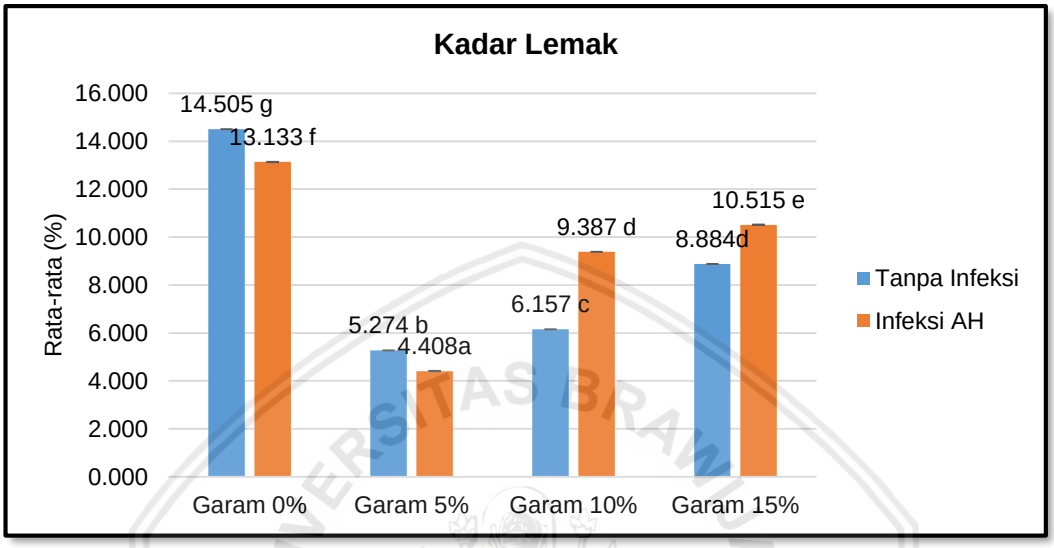
Kadar lemak paling tinggi baik pada perlakuan infeksi maupun tanpa infeksi *Aeromonas hydrophila* terdapat pada perlakuan tanpa penambahan garam yakni 14,505% pada perlakuan tanpa infeksi dan 13,133% pada perlakuan infeksi *Aeromonas hydrophila*. Hal ini dikarenakan tanpa penambahan garam sekalipun, ikan lele (*Clarias* sp.) sudah mengandung nilai gizi lemak. Listyarini, *et al.* (2018) mengatakan, ikan lele pada umumnya mengandung lemak sebesar 0,95—11,5% dari total tubuhnya dan digolongkan dalam bahan pangan berprotein sedang dan lemak rendah.

Kadar lemak paling rendah baik pada perlakuan infeksi maupun tanpa infeksi *Aeromonas hydrophila* terdapat pada perlakuan penambahan garam konsentrasi 5%. Garam selain sebagai pengawet juga berperan sebagai penghambat oksidasi. Oleh karena itu, kemungkinan perubahan asam lemak esensial juga dapat dicegah. Garam yang masuk dalam daging ikan akan mendenaturasi protein dan menginaktifasi enzim yang menyebabkan kerusakan lemak. Konsentrasi garam yang mampu menyebabkan denaturasi protein ialah pada konsentrasi garam 10%. Sari, *et al.* (2012) menambahkan, enzim yang berperan dalam hidrolisis lemak menjadi asam lemak dan triasilgliserol ialah enzim lipase. Oleh karena itu, dapat diduga bahwa pada penelitian ini, penurunan kadar lemak pada penambahan garam dengan konsentrasi 5% akibat penetrasi garam yang kurang sempurna sehingga belum efektif untuk menginaktivasi enzim yang menyebabkan kerusakan lemak sehingga kadar lemak menjadi turun. Penetrasi garam yang kurang sempurna menurut Tumbelaka, *et al.* (2013) mengakibatkan garam tidak masuk ke dalam daging dan kristal garam tertinggal di luar daging.

Sedangkan kadar lemak mengalami kenaikan secara fluktuatif dari perlakuan penambahan garam konsentrasi 5% hingga 15% seiring bertambahnya konsentrasi garam. Garam bersifat higroskopis yang mampu menarik kandungan air di dalam bahan, sehingga akan menaikkan prosentase lemak. Ketika kandungan air turun akibat penambahan garam, maka kadar lemak akan naik. Dikatakan dalam Thariq, *et al.* (2014) bahwa meningkatnya kadar lemak daging ikan diakibatkan oleh garam yang menarik air dari daging. Penurunan kadar air pada bahan pangan akan menaikkan nilai kandungan protein, lemak, karbohidrat, lemak, dan mineral. Namun, vitamin dan zat warna pada umumnya menjadi berkurang. Kadar lemak meningkat seiring bertambahnya konsentrasi garam ini diakibatkan oleh akitivitas enzim proteolitik dan lipolitik yang semakin menurun akibat pengaruh garam. Pada penelitian yang dilakukan Hasan, *et al.* (2015), konsentrasi garam juga mempengaruhi aktivitas enzim lipase dan protease. Hasil penelitian membuktikan aktifitas maksimum enzim lipase terdapat pada konsentrasi garam 3% selanjutnya menurun pada konsentrasi garam 6% namun naik kembali pada konsentrasi garam 9% sebelum turun kembali pada konsentrasi garam 15%. Sebagian enzim menjadi rusak dan tidak aktif dalam larutan garam jenuh. Larutan garam 15% sudah cukup jenuh yang menjadikan aktivitas enzim lebih rendah dibandingkan kadar garam 0%. Dengan menurunnya aktivitas enzim lipase, maka perombakan lipid menjadi asam lemak dan turunannya dapat dicegah sehingga kadar lemak dapat dipertahankan tanpa pengaruh oksidasi.

4.6.2 Analisis Pengaruh Infeksi *Aeromonas hydrophila* terhadap Kadar Lemak

Hasil uji kadar lemak berdasarkan pengaruh infeksi *Aeromonas hydrophila* disajikan pada Gambar 16.



Gambar 15. Diagram rata-rata kadar lemak
(Data Primer, 2019)

Berdasarkan Gambar 16, secara keseluruhan rata-rata kadar lemak pada daging ikan lele (*Clarias* sp.) perlakuan penambahan garam 0% dan 5% secara garis besar lebih tinggi kadar lemaknya pada perlakuan tanpa penginfeksian *Aeromonas hydrophila*. Akan tetapi, pada perlakuan penambahan garam 10% dan 15% secara garis besar kadar lemak lebih tinggi pada perlakuan penginfeksian *Aeromonas hydrophila*. Berdasarkan hasil uji lanjut Duncan, terdapat pengaruh nyata antar perlakuan tanpa penginfeksian maupun dengan penginfeksian yang ditambah garam pada konsentrasi berbeda. Hal ini dibuktikan dengan nilai kadar lemak antara perlakuan tanpa infeksi maupun dengan infeksi *Aeromonas hydrophila* pada konsentrasi garam yang sama memiliki notasi yang berbeda.

Pada perlakuan penambahan garam 0% dan 5% terdapat penurunan kadar lemak secara signifikan dari 14,505% menjadi 5,274% pada perlakuan tanpa infeksi *Aeromonas hydrophila* dan penurunan kadar lemak dari 13,133% menjadi

4,408% pada perlakuan penginfeksian *Aeromonas hydrophila*. Penurunan kadar lemak ini dikarenakan enzim lipase pada fase aktifitas maksimum yang mampu menghidrolisis lemak menjadi asam lemak. Rata-rata kadar lemak pada perlakuan penginfeksian lebih rendah dibanding tanpa penginfeksian. Hal ini diduga akibat pengaruh bakteri yang memproduksi enzim lipase untuk merombak lemak menjadi senyawa yang lebih kecil. Dibuktikan dalam Hadiwiyoto (2019) bahwa lemak dapat mengalami lipolisis oleh enzim-enzim lipase yang dihasilkan dari mikroba. Lipolisis ini selanjutnya membentuk asam lemak bebas yang selanjutnya dapat mengalami oksidasi dan membentuk peroksida, keton, dan aldehid. Tangguda, *et al.* (2015) menambahkan bahwa cemaran mikrobia mampu menurunkan kadar lipid sebanyak 25% akibat aktivitas enzim *membrane-bound oxygenase* yang dihasilkan oleh bakteri dapat meningkatkan kontak antara lipid dan bakteri sehingga bakteri dapat memanfaatkan karbon sebagai sumber energi.

Pada perlakuan penambahan garam konsentrasi 10% hingga 15% mengalami kenaikan kadar lemak secara signifikan yakni dari 6,157% menjadi 8,884% pada perlakuan tanpa infeksi dan kenaikan kadar lemak dari 9,387% menjadi 10,515% pada perlakuan infeksi *Aeromonas hydrophila*. Secara garis besar, rata-rata kadar lemak dari perlakuan penambahan garam 10% dan 15% lebih banyak pada perlakuan penginfeksian *Aeromonas hydrophila* dibandingkan tanpa perlakuan penginfeksian. Menurut Thariq, *et al.* (2014), meningkatnya kadar lemak diakibatkan oleh menurunnya enzim proteolitik seiring dengan penambahan garam. Penggunaan garam jenuh menekan aktivitas enzim lipolitik yang memecah lemak menjadi asam lemak. Penambahan garam menekan aktivitas enzim lipolitik yang berasal dari daging maupun dari mikroba, sehingga jumlah lemak meningkat. Akan tetapi, meningkatnya kadar lemak pada perlakuan infeksi *Aeromonas hydrophila* merupakan fenomena yang secara teoritis tidak terjadi. Hal ini diduga akibat pengaruh ketahanan tubuh atau sistem imun yang dibangun oleh tubuh ikan

lele (*Clarias* sp.) ketika terinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Faktor ini kemudian menyebabkan metabolisme lemak yang dibangun dalam tubuh ikan lele akan berbeda satu sama lain.

4.7 Hasil Uji Angka Peroksida

Berdasarkan hasil uji angka peroksida, terdapat penurunan secara signifikan pada perlakuan penambahan garam dari konsentrasi 0% hingga 15% baik pada perlakuan tanpa infeksi *Aeromonas hydrophila* maupun dengan infeksi *Aeromonas hydrophila*. Hasil uji angka peroksida disajikan pada Tabel 16.

Tabel 12. Hasil uji angka peroksida

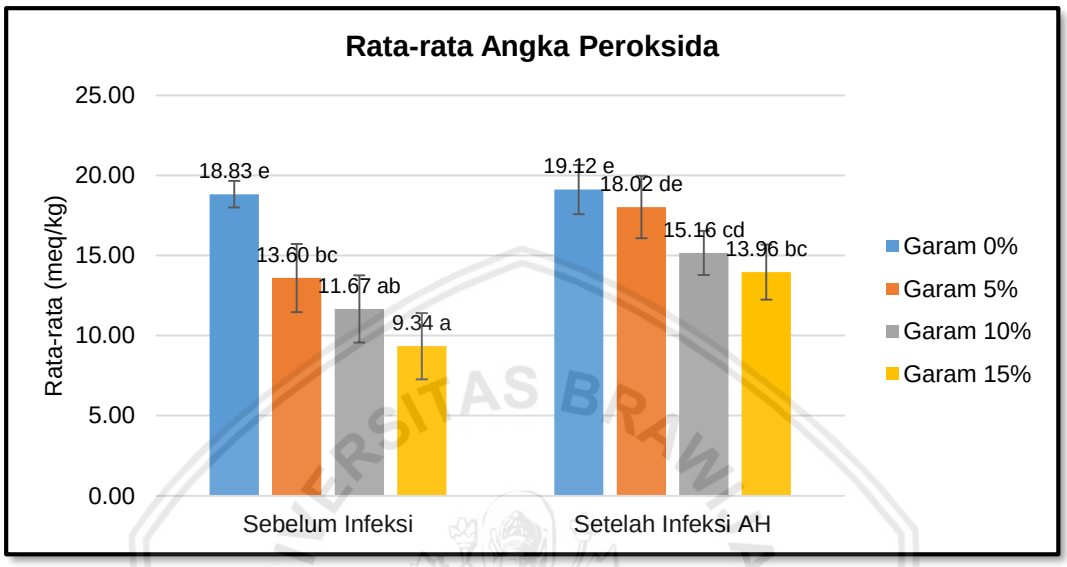
Perlakuan	Ulangan			Rata-rata	Notasi	Stdev
	1	2	3			
K 0%	17,99	19,66	18,83	18,83	e	0,84
K 5%	11,47	15,72	13,60	13,60	bc	2,12
K 10%	9,57	13,76	11,67	11,67	ab	2,10
K 15%	7,27	11,40	9,34	9,34	a	2,07
AH 0%	17,58	20,66	19,12	19,12	e	1,54
AH 5%	16,07	19,97	18,02	18,02	de	1,95
AH 10%	13,78	16,53	15,16	15,16	cd	1,38
AH 15%	12,25	15,67	13,96	13,96	bc	1,71

Sumber: Data Primer, 2019.

Hasil pengujian ANOVA angka peroksida disajikan pada Lampiran 38. Dari hasil sidik ragam ANOVA, menunjukkan bahwa terdapat pengaruh nyata antara perlakuan konsentrasi garam berbeda sebelum dan sesudah infeksi terhadap angka peroksida sampel ikan lele (*Clarias* sp.). Hasil sidik ragam pada taraf 5% yakni menunjukkan nilai *Sig.* 0,000 < 0,05 yang berarti terdapat perbedaan nyata antar perlakuan dalam penelitian terhadap angka peroksida. Sehingga dilakukan uji lanjut menggunakan Uji Duncan. Tabel Uji Duncan angka peroksida disajikan pada Lampiran 37.

4.7.1 Analisis Pengaruh Konsentrasi Garam Berbeda terhadap Angka Peroksida

Hasil uji angka peroksida berdasarkan konsentrasi garam yang berbeda disajikan pada Gambar 17.



Gambar 16. Diagram rata-rata angka peroksida (Data Primer, 2019)

Berdasarkan Gambar 17 pada perlakuan tanpa infeksi maupun infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* terjadi penurunan secara signifikan dari konsentrasi garam 0% hingga 15%. Hasil perhitungan angka peroksida menunjukkan bahwa nilai peroksida dari konsentrasi garam 0% hingga 15% mengalami penurunan dari 18,83 meq/kg menjadi 9,34 meq/kg pada perlakuan sebelum infeksi dan penurunan nilai peroksida dari 19,12 meq/kg menjadi 13,96 meq/kg pada perlakuan setelah infeksi *Aeromonas hydrophila.* Berdasarkan hasil uji lanjut Duncan, perbedaan konsentrasi garam yang ditambahkan terdapat pengaruh nyata antar perlakuan garam. Hal ini dibuktikan dengan nilai peroksida tiap penambahan konsentrasi garam memiliki notasi yang berbeda baik tanpa infeksi maupun dengan infeksi *Aeromonas hydrophila*.

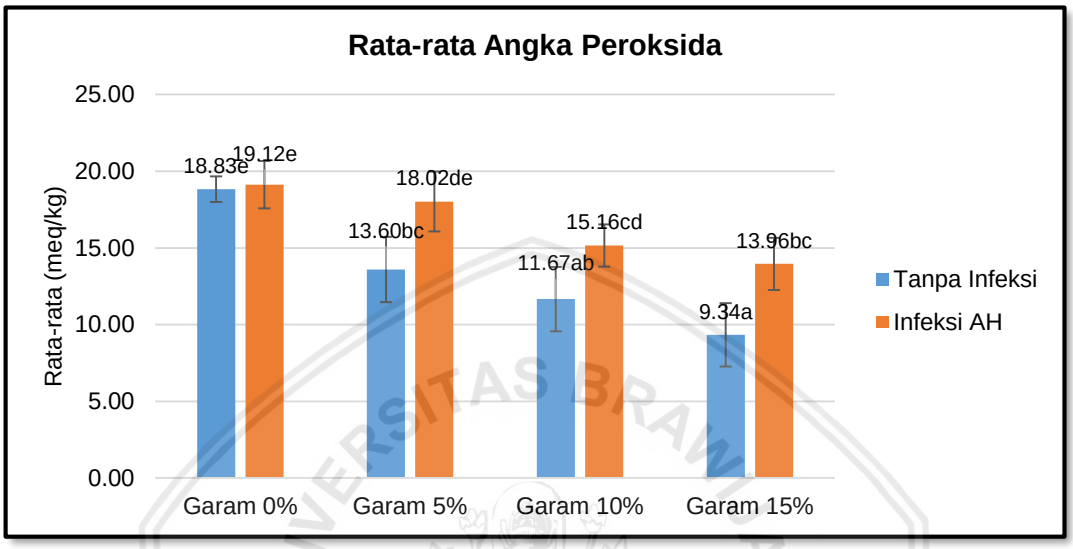
Penurunan angka peroksida seiring dengan pertambahan garam diduga akibat sifat garam yang mampu menghambat proses oksidasi sehingga tidak

terjadi kerusakan lemak yang menghasilkan peroksida pada daging ikan lele (*Clarias* sp.). Menurut Fuadi, *et al.* (2015), bilangan peroksida digunakan untuk menentukan derajat kerusakan minyak dalam satuan *miliequivaent*/kg sampel. Bilangan peroksida dapat terbentuk akibat kontak minyak dengan panas atau udara. Bentuk pertama dari proses autooksidasi pada minyak atau lemak ialah peroksida. Mekanismenya, saat minyak atau lemak kontak dengan udara, maka oksigen akan mengoksidasi ikatan rangkap pada asam lemak tak jenuh dan membentuk senyawa radikal bebas yang kemudian bereaksi dengan oksigen membentuk peroksida aktif. Semakin tinggi nilai peroksida minyak, maka tingkat kerusakan minyak akan semakin tinggi pula.

Pada penelitian ini, angka peroksida paling rendah terdapat pada konsentrasi garam 15%. Sri (2004) mengatakan bahwa efek penambahan garam pada bahan pangan dapat menghambat aktifitas oksidasi yang dapat menyebabkan ketengikan. Dinyatakan bahwa pada kadar garam 15% atau lebih menunjukkan efek antioksidatif. Menurut Suryaningrum, *et al.* (2012), hemoglobin dalam daging ikan mengandung zat besi dalam bentuk ferri sulfat yang mengkatalis oksidasi lemak menjadi asam lemak dan turunanannya. Dalam penelitian yang telah dilakukan, garam mampu menggumpalkan lendir yang terbentuk akibat proses penurunan pH yang terjadi karena garam yang ditambahkan. Lendir merupakan senyawa *mucopolisakarida* yang akan menggumpal bila terkena asam. Berdasarkan FAO (2017) batas angka peroksida minyak ikan ialah ≤ 5 meq/kg. Dari hasil yang didapatkan, tidak ada sampel yang masuk dalam persyaratan batas maksimal angka peroksida minyak ikan. Hal ini diduga bahwa penambahan garam hingga konsentrasi 15% belum mampu menghambat proses oksidasi dan kerusakan minyak lainnya yang terjadi pada minyak hasil ekstraksi ikan lele.

4.7.2 Analisis Pengaruh Infeksi *Aeromonas hydrophila* terhadap Angka Peroksida

Hasil uji angka peroksida berdasarkan pengaruh infeksi *Aeromonas hydrophila* disajikan pada Gambar 18.



Gambar 17. Diagram rata-rata angka peroksida
(Data Primer, 2019)

Berdasarkan Gambar 18, secara keseluruhan rata-rata angka peroksida pada daging ikan lele (*Clarias* sp.) perlakuan tanpa infeksi mengalami penurunan angka peroksida yang lebih rendah dibandingkan dengan angka peroksida pada perlakuan dengan infeksi *Aeromonas hydrophila*. Berdasarkan hasil uji lanjut Duncan, terdapat pengaruh nyata antar perlakuan tanpa penginfeksian maupun dengan penginfeksian yang ditambah garam pada konsentrasi berbeda. Hal ini dibuktikan dengan angka peroksida antara perlakuan tanpa infeksi maupun dengan infeksi *Aeromonas hydrophila* pada konsentrasi garam yang sama memiliki notasi yang berbeda. Akan tetapi, terdapat pengaruh tidak nyata pada perlakuan penambahan garam konsentrasi 0%, yakni menunjukkan notasi yang sama antara perlakuan penginfeksian dan tanpa penginfeksian. Hal ini diduga tidak adanya pengaruh penginfeksian terhadap angka peroksida pada perlakuan tanpa penggaraman. Akan tetapi penginfeksian berpengaruh pada perlakuan

penambahan garam 5% hingga 15% yang mana angka peroksida yang dihasilkan lebih tinggi dibanding tanpa penginfeksian.

Daging yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila* lebih banyak memproduksi lipid peroksidasi dibanding tanpa penginfeksian. Hal ini diakibatkan oleh radikal bebas yang terbentuk merupakan hasil sampingan metabolit bakteri. Menurut Fuadi, *et al.* (2015) faktor-faktor yang mempengaruhi tinggi rendahnya angka peroksida yakni suhu, oksigen, cahaya, kelembapan, dan logam (Fe, Cu, dan Mn). Apabila diinfeksi, *Aeromonas hydrophila* menurut Krzyminska, *et al.* (2011) menyerang sel dengan menghasilkan enterotoksin yang meningkatkan kadar *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) dan Nitrit Oksida (NO). ROS dan NO berpengaruh terhadap kerusakan lipid sehingga menaikkan nilai lipid peroksidasi. Yanuhar (2008) menambahkan, apabila daging terinfeksi mikroba asing, maka pertahanan tubuh akan melakukan proses fagositosis dan menghasilkan senyawa reaktif seperti oksigen dan nitrogen. Apabila tingkat oksigen reaktif intermediate (ROI) yang toksik melebihi batas pertahanan anti-oksidan endogen, maka akan terjadi tekanan oksidatif (*oxidative stress*). Hal inilah yang menyebabkan kelebihan radikal bebas sehingga akan bereaksi dengan lemak yang merupakan biomolekul yang paling rentan terhadap serangan radikal bebas.

Angka peroksida pada perlakuan penambahan garam 0% cukup tinggi dan tidak berbeda nyata antara perlakuan tanpa penginfeksian maupun dengan penginfeksian. Disebutkan dalam Yanuhar (2008), nilai peroksida tersebut menggambarkan bahwa ikan tanpa infeksi sekalipun, tubuh ikan tetap mengandung senyawa radikal bebas. Oksigen reaktif juga diproduksi dalam keadaan normal atau tanpa stress. Hal ini merupakan respon normal dari proses biokimia ekstrasel maupun intrasel untuk menjaga keseimbangan antara pembentukan dan pemusnahan senyawa oksigen reaktif.

4.8 Profil Asam Lemak

Berdasarkan uji profil asam lemak menggunakan instrumen GC-MS didapatkan hasil jumlah *peak* berdasarkan waktu retensinya dan disajikan dalam Tabel 19. Sedangkan gambar kromatogram dan senyawa dugaannya disajikan dalam Lampiran 39 sampai dengan Lampiran 44.

Tabel 13. Perbandingan waktu retensi pada hasil kromatogram tiap sampel

Asam Lemak	Waktu Retensi							
	K 0%	K 5%	K 10%	K 15%	AH 0%	AH 5%	AH 10%	AH 15%
Dekanoat	-	-	-	-	20,317	20,322	20,324	-
Nonanoat	-	-	-	-	24,925	-	-	-
10-Undekanoat	28,713	-	-	-	28,611	-	24,929	-
Oktadekanoat	29,204	29,085	29,084	29,089	29,101	29,099	29,097	29,103
Tetradekanoat	31,166	31,056	-	-	-	31,070	31,068	-
9,12-Oktadekadienoat	32,302	32,177	32,186	32,186	32,199	32,196	32,199	-
11-Oktadekanoat	32,476	32,343	32,354	32,360	32,370	32,369	32,366	-
15-Tetrakosanoat	32,580	-	-	-	-	-	-	-
Tetrakosanoat	32,997	32,882	32,884	32,887	32,895	32,903	32,891	32,368
9,12,15-Oktadekatrienoat	35,148	-	-	-	-	-	-	-
1,3,5-Hexatriene	35,230	-	-	-	-	-	-	-
5,8-Oktadekadienoat	35,490	-	-	-	-	-	-	-
5-Tetradecyne	35,856	-	-	-	-	-	-	-
13-Dokosenoat	35,993	-	-	-	-	-	-	-
Heptakosanoat	36,480	-	-	-	-	-	-	-
6,9,12-Oktadekatrienoat	38,252	-	-	-	-	-	-	-
Jumlah *Peak*	**14**	**5**	**4**	**4**	**7**	**6**	**7**	**2**

Sumber: Data Primer, 2019.

Pada sampel daging ikan lele (*Clarias* sp.) yang tidak terinfeksi *Aeromonas hydrophila* tanpa perlakuan penggaraman terdeteksi adanya 14 *peak* asam lemak dengan waktu retensi yang berbeda-beda. Menurut Novilla, *et al.* (2017) senyawa dengan titik didih terendah akan keluar terlebih dahulu dari kolom sehingga waktu retensinya lebih cepat dibanding senyawa dengan titik didik lebih tinggi. Ditambahkan dalam Ismiyarto, *et al.* (2006) asam lemak dengan rantai hidrokarbon yang semakin panjang maka titik didih akan semakin tinggi.

Peak pertama dengan waktu retensi 28,713 diduga adalah senyawa 10-undekanoat atau asam undesilenat (C:0). *Peak* kedua dengan waktu retensi 29,204 diduga adalah oktadekanoat atau asam stearat (C18:0). Puncak kromatogram dengan nilai m/z 298 dan *base peak* 74 merupakan fragmentasi dari metil stearat (Novilla, *et al.,* 2017). *Peak* ketiga dengan waktu retensi 31,166 diduga adalah senyawa tetradekanoat atau asam miristat (C14:0). Puncak kromatogram dengan nilai m/z 242 merupakan fragmentasi dari metil miristat (Hutami, *et al.*, 2012). *Peak* keempat dengan waktu retensi 32,302 diduga adalah senyawa 9,12-oktadekadienoat atau senyawa linoleat (C18:2n6). Puncak kromatogram dengan nilai m/z 294 merupakan fragmentasi dari metil linoleat (Ismiyarto, *et al.*, 2006). *Peak* kelima dengan waktu retensi 32,476 diduga adalah senyawa 11-oktadekadienoat atau asam vaksenat (C18:1n7). *Peak* keenam dengan waktu retensi 32,580 diduga adalah senyawa 15-tetrakosanoat atau asam nervonat (C24:1n9). *Peak* ketujuh dengan waktu retensi 32,997 diduga adalah senyawa tetrakosanoat atau asam lignoserat (C24:0). *Peak* kedelapan dengan waktu retensi 35,148 diduga adalah senyawa 9,12,15-oktadekatrienoat atau asam α-linolenat (C18:3n3). *Peak* kesembilan dengan waktu retensi 35,230 diduga adalah senyawa 1,3,5-hexatriene atau asam heksadekatrienoat (C16:3n3). *Peak* kesepuluh dengan waktu retensi 35,490 diduga adalah senyawa 5,8-oktadekadienoat. *Peak* kesebelas dengan waktu retensi 35,856 diduga adalah senyawa 5-tetradecyne. *Peak* keduabelas dengan waktu retensi 35,993 diduga adalah senyawa 13-dokosenoat atau asam erukat (C22:1n9). *Peak* ketigabelas dengan waktu retensi 36,480 diduga adalah senyawa heptakosanoat atau asam heptakosiklik. *Peak* keempatbelas dengan waktu retensi 38,252 diduga adalah senyawa 6,9,12-oktadekatrienoat atau asam γ-linolenat (C18:3n6).

Setelah dilakukan penggaraman, diduga terdapat degradasi sejumlah senyawa yang tadinya terdeteksi pada sampel tanpa penggaraman. Jumlah *peak*

pada perlakuan penggaraman konsentrasi 5%, 10%, dan 15% menurun masing-masing menjadi sejumlah 5, 4, dan 4 *peak*. Penurunan jumlah *peak* seiring dengan naiknya konsentrasi garam yang digunakan diduga akibat proses oksidasi yang terjadi pada sampel daging. Hal ini dapat dilihat dari *peak* yang terdeteksi hanya terdapat sedikit asam lemak tak jenuh tunggal maupun ganda. Senyawa asam lemak vaksenat dan linoleat keberadaannya dapat stabil hingga penggaraman 15%. Menurut Novilla, *et al.* (2017) senyawa yang bersifat non polar akan memiliki waktu retensi yang lebih lama dibanding senyawa yang bersifat polar. Asam lemak dengan rantai karbon yang semakin panjang maka memiliki sifat cenderung semakin non-polar. Selain kepolarannya, deteksi dipengaruhi oleh titik didih senyawa. Senyawa dengan titik didih lebih rendah cenderung memiliki waktu retensi yang lebih singkat. Ditambahkan dalam Marlina, *et al.* (2017) bahwa penambahan garam pada bahan maka akan menyebabkan penurunan tingkat kelarutan protein (*salting in*) diikuti oleh pengikatan molekul air oleh garam tersebut dan terjadi pemisahan antara minyak dengan air (*salting out*). Akan tetapi, dalam uji bilangan asam, konsentrasi garam 6 gram NaCl dapat meningkatkan bilangan asam sebanyak 0,54 menandakan bahwa asam lemak bebasnya tinggi. Hal ini merupakan indikator kerusakan minyak. Hal ini diduga menjadi penyebab turunnya jumlah *peak* atau asam lemak yang terdeteksi, yaitu garam yang berkorelasi positif terhadap kerusakan minyak.

Pada sampel daging ikan lele (*Clarias* sp.) dengan penginfeksian bakteri *Aeromonas hydrophila* tanpa penggaraman, terdeteksi terdapat penurunan jumlah *peak* dibanding tanpa infeksi yakni menjadi sejumlah 7 *peak.* Beberapa senyawa pada sampel tanpa penginfeksian tidak terdeteksi dan muncul dua senyawa baru pada waktu retensi 20,317 dan diduga merupakan senyawa dekanoat atau asam kaprat (C10:0) serta pada waktu retensi 24,925 diduga merupakan senyawa nonanoat atau asam pelargonat (C9:0). Pada perlakuan penginfeksian dengan

penggaraman konsentrasi 5%, jumlah *peak* yang muncul menjadi 6 *peak* dan naik kembali pada konsentrasi 10% menjadi 7 *peak*. Akan tetapi, jumlah *peak* paling rendah terdapat pada perlakuan penginfeksian dengan penggaraman konsentrasi 15% yakni hanya terdeteksi sejumlah 2 *peak*. Hal ini diduga akibat pengaruh bakteri *Aeromonas hydrophila* yang mendegradasi lemak dan memakai karbon sebagai sumber nutrisinya.

Beberapa strain *Aeromonas hydrophila* dapat memproduksi racun *aerolysin*. *Aerolysin* merupakan protein ekstraseluler yang dapat larut dan bersifat hemolitik serta sitolitik. *Aerolysin* ini masuk ke dalam glikoprotein spesifik pada permukaan sel sebelum masuk ke lapisan lemak dan membentuk lubang. Kemudian racun tersebut masuk ke dalam membran sel bakteri sebagai preprotoksin yang mengandung peptida. *Aerolysin* bekerja dengan menyerang sel-sel epithelia serta menyebabkan gastroenteritris (Lukistyowati dan Kurniasih, 2012). *Aeromonas hydrophila* telah terbukti dapat memproduksi enzim lipase (NCBI, 2019). Enzim lipase yang diproduksi berperan dalam mengkatalis hidrolisis lemak menjadi asam-asam lemak dan gliserol (Puspaningsih, *et al.*, 2013). Guizani, *et al.* (2014) menambahkan bahwa terjadi penurunan kadar profil asam lemak esensial PUFA, EPA, dan DHA akibat proses penggaraman.

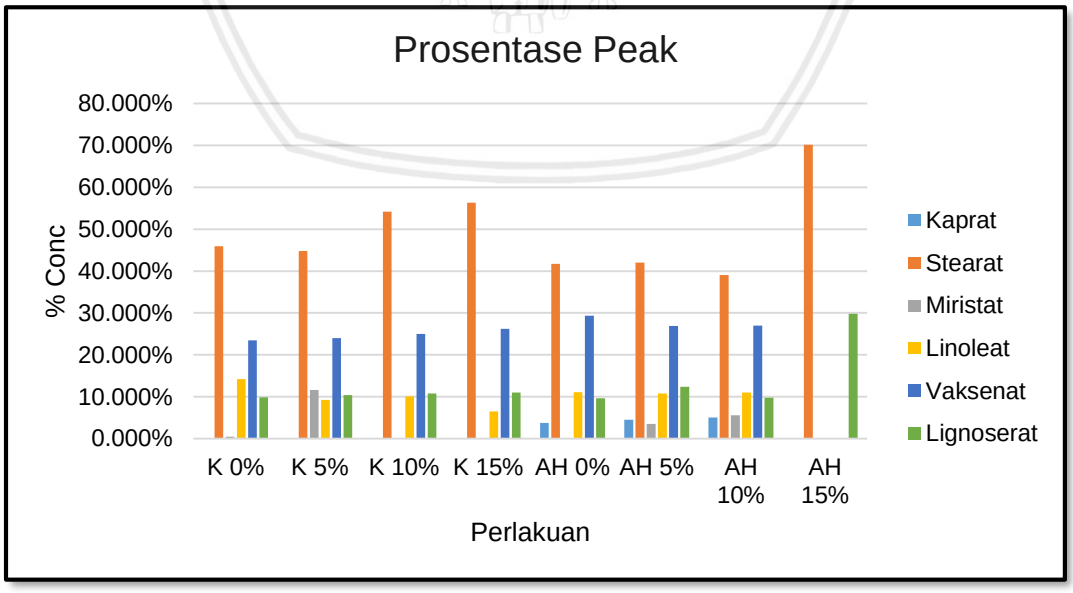
Tidak seluruh asam lemak dapat terdeteksi. Faktor yang menyebabkan hal tersebut diantaranya disebabkan oleh waktu penyimpanan sampel uji yang kurang baik serta kesalahan pada tahap kritis yakni proses preparasi. Oksidasi dan degradasi dapat terjadi apabila penyimpanan sampel kurang baik. Proses preparasi saat saponifikasi dan metilasi kurang optimal sehingga tidak seluruh asam lemak yang terkandung dapat diubah menjadi FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*) yang mudah dideteksi oleh instrumen GC-MS (Novilla, *et al*., 2017).

Berdasarkan jumlah prosentase *peak* yang muncul pada kromatogram hasil uji profil asam lemak, didapatkan konsentrasi masing-masing *peak* seperti pada Tabel 20 dan Gambar 19 sebagai berikut.

Tabel 14. Perbandingan prosentase area pada hasil kromatogram tiap sampel

Asam Lemak	Prosentase (% *Conc*)							
	K 0%	**K 5%**	**K 10%**	**K 15%**	**AH 0%**	**AH 5%**	**AH 10%**	**AH 15%**
Asam kaprat	-	-	-	-	3,734	4,471	5,007	-
Asam pelargonat	-	-	-	-	3,275	-	-	-
Asam undesilenat	0,727	-	-	-	1,233	-	3,145	-
Asam stearat	45,943	44,795	54,200	56,302	41,710	41,998	39,051	70,196
Asam miristat	0,448	11,595	-	-	-	3,523	5,061	-
Asam linoleat	14,203	9,206	10,053	6,501	11,049	10,732	10,995	-
Asam vaksenat	23,420	23,982	24,958	26,184	29,376	26,907	26,974	-
Asam nervonat	1,689	-	-	-	-	-	-	-
Asam lignoserat	9,853	10,422	10,790	11,013	9,623	12,368	9,768	29,802
Asam α-linolenat	0,552	-	-	-	-	-	-	-
Asam heksadekatrienoat	0,298	-	-	-	-	-	-	-
5,8-Oktadekadienoat	0,532	-	-	-	-	-	-	-
5-Tetradecyne	0,217	-	-	-	-	-	-	-
Asam erukat	0,446	-	-	-	-	-	-	-
Asam heptakosiklik	0,170	-	-	-	-	-	-	-
Asam γ-linolenat	1,503	-	-	-	-	-	-	-
Jumlah	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**

Sumber: Data Primer, 2019.



Gambar 18. Histogram prosentase *peak* asam lemak dominan (Data Primer, 2019)

Berdasarkan prosentase area *peak* pada sampel daging ikan lele (*Clarias* sp.) yang tidak terinfeksi *Aeromonas hydrophila* dengan perlakuan tanpa penggaraman, diduga sampel tersebut memiliki kelimpahan senyawa asam lemak stearat (45,943%), vaksenat (23,420%), linoleat (14,203%), lignoserat (9,853%), undesilenat (0,727%), dan miristat (0,448%). Setelah daging ikan lele tersebut diberi perlakuan garam rata-rata konsentrasi *peak* terbesar terdapat pada senyawa asam lemak stearat (C18:0) yang terdapat pada seluruh perlakuan penambahan garam, bahkan mencapai 56,302% pada perlakuan penambahan garam 15%. Sedangkan rata-rata konsentrasi *peak* terendah terdapat pada asam lemak linoleat (C18:2n6). Selain itu, terdapat beberapa senyawa asam lemak yang hilang setelah penggaraman. Sejumlah senyawa yang hilang tersebut ialah asam lemak undesilenat, asam nervonat, asam α-linolenat, asam heksadekatrienoat, asam 5,8-oktadekadienoat, asam 5-tetradecyne, asam erukat, asam heptakosiklik, dan γ-linolenat. Sedangkan pada perlakuan penggaraman 10% dan 15%, senyawa asam lemak miristat hilang. Semakin tinggi konsentrasi garam yang ditambahkan, maka sejumlah senyawa turun konsentrasinya bahkan hilang. Hal ini diduga akibat aktivitas garam yang berkorelasi terhadap aktivitas enzim lipase. Dijelaskan dalam Dzudie, *et al.* (2003) bahwa garam dalam daging mengalami kenaikan pH akibat penambahan garam 2,5%—10% yakni menjadi 5,5—5,6. Aktivitas lipase optimal pada pH 8—9 (Winarno, 2000) akan tetapi dapat berubah sesuai substratnya menjadi optimum pada pH 6—7. Hal ini mengakibatkan garam berkorelasi positif dengan adanya autooksidasi.

Pada sampel daging ikan lele (*Clarias* sp.) dengan penginfeksian bakteri *Aeromonas hydrophila*, terdapat banyak senyawa asam lemak yang hilang serta kemunculan dua senyawa asam lemak baru. Diduga pada sampel tersebut memiliki kelimpahan senyawa asam lemak stearat, vaksenat, linoleat, lignoserat, kaprat, miristat, dan undesilenat. Senyawa asam lemak kaprat (C10:0) dan

pelargonat (C9:0) merupakan senyawa baru yang muncul akibat perlakuan penginfeksian *Aeromonas hydrophila*. Pada perlakuan penginfeksian dengan penggaraman 5%, senyawa asam lemak pelargonat dan undesilenat hilang, akan tetapi asam miristat kembali muncul. Pada perlakuan penginfeksian dengan penggaraman 10%, asam lemak undesilenat kembali muncul. Sedangkan pada perlakuan penginfeksian dengan penggaraman 15%, hanya tersisa dua senyawa asam lemak yang terdeteksi yakni senyawa asam lemak stearat dan lignoserat.

Biodegradasi ialah suatu perombakan secara biologi oleh agen biologis menjadi senyawa yang lebih sederhana. Hal ini membuktikan kemampuan mikrobiologi dalam menggunakan senyawa karbon hasil degradasi sebagai sumber energi. Kecepatan mikroba dalam mendegradasi tergantung pada faktor-faktor seperti struktur hidrokarbon (Umar, 2015). Berbagai mekanisme memungkinkan efisiensi penggunaan senyawa sebagai sumber karbon atau sumber energi. Diketahui genus *Aeromonas* mampu mendegradasi PAHs (*Polycyclic Aromatic Hidrocarbon*) melalui proses metabolisme atau kometabolisme (Kurniawan, *et al.*, 2018).

- **Analisis Senyawa SFA (*Saturated Fatty Acid*)**

SFA atau asam lemak jenuh yang terdapat pada daging ikan lele (*Clarias* sp.) tanpa penginfeksian dan penggaraman ialah asam miristat (C14:0), asam stearat (C18:0), asam lignoserat (C24:0), dan asam heptakosiklik. Jumlah asam lemak jenuh yang cukup banyak digunakan ikan lele sebagai sumber energi. Akan tetapi setelah penggaraman, asam lemak jenuh (SFA) stearat (C18:0) dan lignoserat (C24:0) mengalami kenaikan. Hal ini diduga akibat hidrolisis senyawa PUFA pada daging ikan lele sehingga berubah menjadi asam lemak jenuh. Asam lemak miristat (C14:0) hanya terdeteksi hingga konsentrasi garam 5% kemudian keberadaannya menghilang. Hal ini diduga akibat keberadaannya yang sedikit

(0,448% pada konsentrasi garam 0% dan 11,595% pada konsentrasi garam 5%) sehingga terdegradasi membentuk senyawa asam lemak jenuh yang lain. Begitu pula pada asam lemak heptakosiklik yang keberadaannya sangat kecil (0,170%) sehingga terjadi degradasi pada saat penambahan garam.

Setelah daging ikan lele (*Clarias* sp.) terinfeksi oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* tanpa perlakuan penggaraman, secara keseluruhan keberadaan asam lemak jenuh (SFA) menurun dan terdapat dua senyawa baru. Hal ini diduga akibat pengaruh bakteri *Aeromonas hydrophila* yang menggunakan asam lemak sebagai sumber karbon untuk tumbuh sehingga jumlahnya menjadi berkurang dan terjadi beberapa senyawa yang mengalami hidrolisis menjadi senyawa baru yakni asam lemak kaprat (C10:0) dan pelargonat (C9:0). Munculnya senyawa baru diduga akibat pengaruh *Aeromonas hydrophila* yang mendegradasi sebagian besar PUFA dan MUFA sehingga muncul senyawa baru dengan rantai karbon yang lebih pendek. Winarno (2000) menambahkan bahwa PUFA bersifat mudah terkena kerusakan akibat oksidasi dan membentuk senyawa hidroperoksida yang sangat tidak stabil dan mudah pecah menjadi senyawa dengan rantai karbon yang lebih pendek. Setelah dilakukan penggaraman, kenaikan dapat dilihat pada asam lemak stearat, kaprat, miristat, dan lignoserat. Asam lemak pelargonat tidak terdeteksi akibat penggaraman. Hal ini diduga akibat jumlah rantai karbon yang sedikit (C9:0) sehingga mudah mengalami degradasi akibat proses penggaraman.

- **Analisis Senyawa MUFA (*Mono Unsaturated Fatty Acid*)**

Pada daging ikan lele (*Clarias* sp.) tanpa infeksi dan penggaraman, terdapat 5 (lima) asam lemak tak jenuh tunggal berupa asam vaksenat (C18:1), asam undesilenat, asam erukat (C22:1), asam nervonat (C24:1n9), dan asam 5-tetradecyne. Akan tetapi, setelah penggaraman, asam lemak tak jenuh tunggal (MUFA) pada daging ikan lele dominan hilang akibat degradasi menjadi bentuk

senyawa lain dan hanya terlihat kenaikan jumlah pada asam lemak vaksenat (C18:1) dari konsentrasi garam 0%, 5%, 10%, dan 15% berturut-turut ialah: 23,430%, 23,982%, 24,958%, dan 26,184%. Hal ini sesuai dengan pernyataan Titiek (2014) bahwa pada minyak ikan lele (*Clarias* sp.) komposisinya didominasi oleh senyawa dengan jumlah karbon 16—18 atau C16:1 dan C18:1 sedangkan C20:1 dan C22:1 pada lele rendah dan didominasi oleh ikan laut. Beberapa asam lemak tak jenuh yang lain tidak terdeteksi lagi diduga akibat adanya dekomposisi lemak. Garam mineral mampu menyebabkan dekomposisi lemak.

Setelah daging terinfeksi *Aeromonas hydrophila*, keberadaan asam lemak tak jenuh tunggal (MUFA) seperti asam lemak vaksenat mengalami kenaikan hingga konsentrasi garam 10% dan menghilang pada konsentrasi garam 15%. Bahkan, tidak ada senyawa asam lemak tak jenuh tunggal yang terdeteksi pada konsentrasi garam 15%. Hal ini diduga akibat pengaruh bakteri *Aeromonas hydrophila* yang mendegradasi lemak dan akibat pengaruh garam yang mendukung proses perombakan lemak. Asam lemak undesilenat terdeteksi dalam jumlah kecil pada perlakuan tanpa penggaraman dan keberadaannya tidak stabil seiring dengan kenaikan konsentrasi garam yang digunakan. Menurut Swandi, *et al*. (2015), lemak yang terkandung dalam daging merupakan substrat yang dibutuhkan bakteri lipolitik karena dapat berfungsi sebagai sumber karbon untuk nutrisi pertumbuhan dan sebagai pengemulsi untuk meningkatkan biodegradasi lipid. Akan tetapi, kemampuan degradasi lipid bergantung pada faktor adaptasi bakteri terhadap lingkungan. Pada penggaraman 15%, asam lemak tak jenuh tunggal yang hilang diduga dominan akibat pengaruh garam jenuh yang ditambahkan. Bakteri *Aeromonas hydrophila* cenderung menurun jumlahnya pada kondisi garam 15%, oleh karena itu dapat diduga bahwa garam memiliki peran lebih dominan sebagai prooksidan dengan cara mendegradasi lemak menjadi senyawa yang lebih sederhana.

- **Analisis Senyawa PUFA (*Poli Unsaturated Fatty Acid*)**

Pada daging ikan lele (*Clarias* sp.) yang tidak terinfeksi *Aeromonas hydrophila* tanpa perlakuan garam, terdapat 5 (lima) jenis asam lemak tak jenuh jamak (PUFA) berupa asam heksadekatrienoat (C16:3), asam linoleat (C18:2n6), asam α-linolenat (C18:3n3), asam γ-linolenat (C18:3n6), dan asam 5,8-oktadekadienoat. Ikan lele (*Clarias* sp.) merupakan ikan air tawar yang memiliki kekayaan asam lemak omega-6. Sedangkan seiring penambahan garam, asam lemak tak jenuh jamak terdegradasi dan hanya asam lemak linoleat (C18:2n6) yang stabil hingga konsentrasi garam 15%. Akan tetapi, keberadaan asam lemak linoleat tidak stabil seiring bertambahnya konsentrasi garam. Aisjah (1986) mengatakan bahwa penurunan konsentrasi linolenat pada daging ikan berkadar garam 20% akibat peristiwa plasmolisis karena pengaruh garam. Bukan hanya air yang ditarik keluar akan tetapi, asam lemak juga mengalami hal yang sama. Air berperan dalam pendispersian senyawa amfipatik, yakni senyawa yang sekaligus mengandung gugus hidrofobik dan gugus hidrofilik. Dalam sistem yang terbentuk, fase hidrofilik berdispersi membentuk misel dan ekor hidrokarbon sebagai fase hidrofobik. Kebanyakan lipid dalam membran sel bersifat lipid polar sehingga dapat rusak akibat tekanan osmotik tinggi dan ikut keluar bersama air.

Setelah dilakukan penginfeksian bakteri *Aeromonas hydrophila*, hanya terdapat asam lemak tidak jenuh jamak (PUFA) yakni asam lemak linoleat (C18:2n6) dan keberadaannya hilang pada konsentrasi garam 15%. Kadar garam erat hubungannya dengan kadar air. Garam akan mengikat sejumlah molekul air melalui sistem plasmolisis (Suwamba, 2008). Kadar air akan semakin turun seiring naiknya konsentrasi garam. Sehingga, hal ini menyebabkan turunnya aktivitas mikroba dan enzimatis pada bahan pangan. Aktivitas enzimatis dapat berupa aktivitas enzim dari lipase yang menghidrolisis lemak menjadi asam lemak. Kadar garam 15% diketahui telah dapat menunjukkan efek antioksidatif. Akan tetapi,

dalam studi lain, garam juga diduga dapat mengkatalisa oksidasi melalui aktivitas lipoksidase atau mioglobin. Ketengikan yang diinduksi oleh garam tidak dapat mengubah hidroperoksida menjadi monokarbonil, akan tetapi pada bahan pangan rendah lemak, terjadi konversi dari hidroperoksida menjadi monokarbonil (Sri, 2004). Konsentrasi asam lemak linoleat yang semakin turun pada perlakuan baik tanpa infeksi maupun dengan infeksi *Aeromonas hydrophila*, diduga dapat diakibatkan oleh kerusakan bahan pangan akibat reaksi mikrobiologis. Hernandez-Herrero, *et al*. (2002) menemukan *microbial flora* yang ditemukan pada konsentrasi garam 19—20%. Moelyanto (1968) menambahkan bahwa garam selain sebagai pengawet juga berpengaruh positif terhadap oksidasi. Selain itu, Anindita, *et al.* (2018) mengatakan bahwa hasil metabolisme asam linoleat oleh mikrobia menunjukkan bahwa asam linoleat dikonversi menjadi asam lemak dengan rantai lebih pendek yakni asam stearat (18:0) dan asam palmitat (16:0) melalui biohidrogenasi. Hal ini diduga terjadi pada perlakuan penggaraman konsentrasi 15% dengan infeksi *Aeromonas hydrophila*, asam linoleat hilang dan terjadi kenaikan secara drastis pada asam lemak stearat hingga mencapai 70,198%. Berdasarkan jumlah tersebut, diduga terdapat lebih banyak produksi enzim reduktase sehingga proses hidrogenasi (pengubahan ikatan rangkap menjadi tunggal) lebih dominan.

Secara teori *Aeromonas hydrophila* telah ditemukan mampu memakai karbon sebagai sumber nutrisi sehingga terjadi perubahan ikatan rangkap menjadi tunggal, dalam hal ini asam lemak tak jenuh menjadi turun dan terjadi kenaikan pada asam lemak jenuh. Apabila dianalisis melalui asumsi lain, jumlah *Aeromonas hydrophila* dalam nilai TPC semakin menurun seiring bertambahnya garam. Oleh karena itu, aktivitas *Aeromonas hydrophila* dalam mendegradasi lemak melalui produksi enzim akan menurun. Dari berbagai teori yang dikemukakan, didapatkan suatu kesimpulan bahwa bahwa perubahan jumlah asam lemak tak jenuh ini tak

dapat dihindari dari pengaruh garam yang diduga dominan menyebabkan turunnya PUFA dan naiknya asam stearat. Pada kondisi 15% merupakan garam dengan konsentrasi tertinggi, oleh karena itu, diduga garam berpengaruh besar terhadap perubahan jumlah asam lemak melalui aktivitas oksidasi. Dalam hal ini, garam selain mampu berperan sebagai anti oksidatif, tetapi dalam kondisi tertentu juga mampu berperan sebagai prooksidan yang mengkatalisis oksidasi lemak terutama asam lemak tak jenuh jamak/PUFA.

- **Analisis Profil Asam Lemak Daging Ikan Lele (*Clarias* sp.) terhadap Kebutuhan Gizi Asam Lemak Esensial**

Asam lemak esensial dibutuhkan oleh tubuh dari makanan yang dikonsumsi manusia. Asam lemak esensial seperti omega-3 dapat dengan mudah didapatkan dari ikan air tawar. Lele (*Clarias* sp.) yang telah diuji profil asam lemaknya terbukti mengandung ikatan rangkap yang cukup banyak. Proses pengolahan ikan salah satunya dengan penggaraman sebelum dimasak, dalam konsentrasi garam 5% hingga 15% terbukti mengalami penurunan jenis asam lemak yang terdeteksi oleh instrumen GC-MS seiring bertambahnya konsentrasi garam. Hal ini diduga oleh adanya pengaruh garam yang berkorelasi positif terhadap penurunan jenis asam lemak. Telah disebutkan bahwasannya garam memiliki peran sebagai penghambat oksidasi akan tetapi dapat menjadi prooksidan dengan konsentrasi tinggi atau jenuh. Ikatan rangkap yang dibutuhkan oleh tubuh manusia sebagai kebutuhan gizi yang didapatkan dari makanan, turun seiring penambahan garam. Yakni hanya terdeteksi asam vaksenat (C18:1) dan asam linoleat (C18:2) sedangkan senyawa esensial lain hilang. Hal ini mengakibatkan tidak terpenuhinya kebutuhan gizi asam lemak esensial berupa asam lemak tak jenuh yang baik bagi tubuh manusia. Akan tetapi, asam lemak jenuh (SFA) mengalami peningkatan pada asam lemak jenuh rantai panjang yakni

stearat (C18:0) dan lignoserat (C24:0). Menurut Sartika (2008) dalam penelitian telah dibuktikan bahwa asam palmitat dalam minyak kelapa tidak dapat menyebabkan peningkatan kadar kolesterol darah. Asupan asam lemak jenuh rantai panjang (LSFA) menyebabkan peningkatan kadar kolesterol darah yang berbeda daripada asam lemak jenuh rantai medium (MSFA).

Pada perlakuan infeksi *Aeromonas hydrophila*, terjadi fenomena yang sama yakni penurunan jenis asam lemak tak jenuh yang terdeteksi. Bahkan tidak ditemukan asam lemak tak jenuh pada penggaraman 15%. Keberadaan *Aeromonas hydrophila* menjadi faktor utama hilangnya asam lemak esensial. Keadaan daging ikan lele (*Clarias* sp.) dengan infeksi *Aeromonas hydrophila* tanpa penggaraman tidak baik terhadap kesehatan walaupun menunjukkan jumlah asam lemak esensial yang lebih banyak dibanding dengan penggaraman. Hal ini menjadikan garam belum mampu mempertahankan keberadaan asam lemak esensial dalam daging ikan lele secara signifikan. Padahal, keberadaan garam mampu berperan sebagai bakteriosidal terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophila*. Akan tetapi, jumlah atom karbon yang masih panjang dapat ditemui pada perlakuan penggaraman tanpa infeksi *Aeromonas hydrophila* pada konsentrasi garam 5% hingga 15%. Hal ini lebih baik untuk dikonsumsi dibanding dengan daging yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila*. Penggaraman mampu berperan sebagai pencegahan pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* sehingga keberadaannya dibutuhkan dalam pengolahan walaupun menurunkan profil asam lemak yang terdeteksi dan hanya menyisakan asam lemak esensial yaitu linoleat. Sesuai dengan Sartika (2008), salah satu komponen utama makanan yang memberikan dampak positif terhadap kesehatan adalah lemak yang multifungsi, yaitu sebagai penyumbang energi terbanyak serta merupakan sumber asam lemak linoleat dan linolenat.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian mengenai profil asam lemak pada daging ikan lele (*Clarias* sp.) yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila* secara artifisial didapatkan kesimpulan sebagai berikut. Profil asam lemak didominasi oleh senyawa asam lemak kaprat (C10:0), stearat (C18:0), miristat (C14:0), linoleat (C18:2n6), vaksenat (C18:1n7), dan lignoserat (C24:0). Penambahan garam pada konsentrasi berbeda berpengaruh terhadap profil asam lemak ikan lele (*Clarias* sp.), baik tanpa infeksi maupun dengan infeksi *Aeromonas hydrophila*. Konsentrasi garam yang mampu mencegah keberadaan *Aeromonas hydrophila* ialah pada konsentrasi di atas 10%. Garam berperan sebagai penghambat bakteri, namun juga mampu menurunkan konsentrasi asam lemak sehingga jumlah asam lemak tidak jenuh jamak (PUFA) yang baik bagi kesehatan turun dan asam lemak jenuh (SFA) naik seiring penambahan garam.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, disarankan untuk dilakukan pengolahan lebih lanjut terhadap daging ikan lele (*Clarias* sp.) seperti pengolahan menggunakan energi panas. Serta dilakukan pengujian terhadap konsentrasi garam terbaik yang mampu mempertahankan asam lemak esensial dalam daging ikan lele (*Clarias* sp.).

DAFTAR PUSTAKA

Aboyadak, I. M., Ali, N. G. M., Goda, A. M. A. S., Saad, W., and Salam, A. M. E. 2017. Non-selectivity of R-S media for *Aeromonas hydrophila* and TCBS media for *Vibrio* species isolated from diseased *Oreochromis niloticus*. *Journal of Aquaculture Research & Development*. **8** (7).

Adeniyi, S. A., Orjiekwe, C. L., Ehiagbonare, J. E., and Josiah, S. J. 2012. Nutritional composition of three different fishes (*Clarias gariepinus, Malapterurus electricus, Tilapia guineensis*). *Pakistan Journal of Nutrition*. **11** (9): 891—895.

Adinugraha, B. S. dan Wijayaningrium, T. N. Rancangan acak lengkap dan rancangan acak kelompok pada bibit ikan. *Seminar Nasional Pendidikan, Sains, dan Teknologi*. ISBN: 978-602-61599-6-0.

Agger, W. A. 1986. Diarrhea associated with *Aeromonas hydrophila*. *Pediatric Infectious Disease*. **5** (1): 106—108.

Aisjah G. 1986. Biokimia I. Gramedia. Jakarta.

Almunady, T. P. 2012. Analisis kualitatif dan kuantitatif asam lemak tak jenuh omega-3, omega-6, dan karakterisasi minyak ikan patin (*Pangasius pangasius*). *Jurnal Penelitian Sains*.

Amahorseja, A. L. 2018. Profil asam lemak ikan tuna (*Thunnus* sp.) asap. *Jurnal HIBUALAMO*. **2** (1): 47—57.

Amalia, Dwiyanti, R. D., dan Haitami. 2016. Daya hambat NaCl terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Medical Laboratory Technology Journal*. **2** (2): 42—25.

Aminullah, Mardiah, Riandi, M. R., Argani, A. P., Syahbirin, G., dan Kemala, T. 2018. Kandungan total lipid lemak ayam dan babi berdasarkan perbedaan jenis metode ekstraksi lemak. *Jurnal Agroindustri Halal*. **4** (1): 1—7.

Andriani, R. 2016. Pengenalan alat-alat laboratorium mikrobiologi untuk mengatasi keselamatan kerja dan keberhasilan praktikum. *Jurnal Mikrobiologi.* **1** (1): 1—7.

Anggarasari, Y., Luqman, E. M., Poernomo, B., dan Handijatno, D. 2014. Pengaruh pemaparan karbofuran terhadap gambaran diameter pulpa putih limpa mencit (*Mus musculus*). *Veterinaria Medika*. **7** (2): 100—105.

Anggraeni, R., D. Aliza, dan S. Mellisa. 2016. Identifikasi bakteri aeromonas hydrophila dengan uji mikrobiologi pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang dibudidayakan di kecamatan baitussalam kabupaten aceh besar. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kelautan dan Perikanan Unsyiah.* **1** (2): 270—289.

Anindita, N. S., Anwar, M., Widodo, Taufiq, T. T., dan Wahyuningsih, T. D. 2018. Kemampuan metabolisme asam linoleat oleh kandidat probiotik potensial asal feses bayi asli Indonesia. *JheS.* **2** (1).

Antriana, N. 2014. Isolasi bakteri asal saluran pencernaan rayap pekerja (*Macrotermes* spp.). *Saintifika*. **16** (1): 18—28.

Arwin, M., Ijong, F. G., and Tumbol, R. 2016. Characteristics of *Aeromonas hydrophila* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic Science and Management.* **4** (2): 52—55.

Assadad, L. dan Utomo, B. S. B. 2011. Pemanfaatan garam dalam industri pengolahan produk perikanan. *Squalen*. **6** (1): 26—37.

Austin, B. and D.A. Austin. 2007. *Bacterial Fish Patogen : Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish.* John Wiley and Sons. New York.

Awan, F., Dong, Y., Wang, N., Liu, J., Ma, K., and Liu, Y. 2018. The fight for invincibility: environmental stress response mechanisms and *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*. **116**: 135—145.

Badan Pusat Statistik. 2012. Statistik Kelautan dan Perikanan Tahun 2012. Kementerian Kelautan dan Perikanan. Jakarta. 129 hlm.

Blaszk, B. F. 2014. Phenotypic and molecular characteristics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from the River Nile. *Microbiological Research*. **169**: 547—552.

Burhanuddin. 2001. Komposisi Garam untuk Menghambat Bakteri *Aeromonas hydrophila.* Kanisius. Yogyakarta.

Cahyani, V.R. 2009. Pengaruh beberapa metode sterilisasi tanah terhadap status hara, populasi mikroba, potensi infeksi mikorisa dan pertumbuhan tanaman. *Jurnal Ilmiah Ilmu Tanah dan Agroklimatologi.* **6** (1): 43—52.

Castro, N., Toranzo, A. E., Nunez, S., and Magarinos, B. 2011. Evaluation of the selective and differential ET medium for detection of *Edwardsiella tarda* in aquaculture systems. *Letters in Applied Microbiology*. 119—119.

Cowan, S.T. and Steels. 2003. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Third Edition. Cambridge University Press. Cambridge.

Darmapatni, K. A. G., Basori, A., dan Suaniti, N. M. 2016. Pengembangan metode GC-MS untuk penetapan kadar *Acetaminophen* pada spesimen rambut manusia. *Jurnal Biosains Pascasarjana*. **18** (3): 1—13.

Diningrat, D. S., Restuati, M., Kusdianti, Sari, A. N., dan Mawarni, E. 2018. Analisis ekstrak etanol tangkai daun buasbuas (*Premna pubescens*) menggunakan *Gass Chromatography Mass Spectrophotometer* (GCMS). *Journal of Islamic Science and Technology*. **4** (1): 1—12.

Dwinanti, S. H. dan Tanbiyaskur. 2014. Rekayasa media padat nonselektif untuk bakteri akuatik. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **13** (2): 163—166.

Dzudie, T. 2003. Effect of salt dose on the quality of dry smoked beef. *Journal Food Science*. **15** (3).

Effiong, B. N. and Fakunle, J. O. 2013. Fatty acid composition of catfish (*Clarias garipenius*) viscera oil. *Journal of Fisheries and Aquaculture Science*. **8** (1): 299—301.

FAO. 2017. Standard For Fish Oils CSX 329-2017. (online) http://www.fao.org /fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/zh/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B329-2017%252FCXS_329e.pdf. Diakses pada 29 April 2019.

Fardiaz. 1988. Mikrobiologi Pengolahan Pangan Lanjut. IPB Press. Bogor.

Fuadi, A., Supriadi, A., dan Nopianti, R. 2015. Evaluasi keamanan ikan asap di Dusun I Epil Kecamatan Lais Kabupaten Musi Banyuasin. *Jurnal Teknologi Hasil Perikanan*. **4** (2): 148—157.

Gani, A. A., Mukarlina, dan Rusmiyanto, E. 2017. Profil GC-MS dan potensi bioherbisida ekstrak metanol daun ketapang (*Terminallia catappa* L.) terhadap gulma maman ungu (*Cleome rutidosperma* D. C.). *Protobiont*. **6** (2): 22—28.

Guizani, N., Rahman, M. S., and Al-Ruzeiqi, M. H. 2014. Effects of brine concentration on lipid oxidation and fatty acids profile of hot smoked tuna (*Thunnus albacores*) stored at refrigerated temperature. *J.Food Sci Technol.* **51** (3): 577—582.

Haditomo, A. H. C., Widanarni, dan Luasiastuti, A. M. 2014. Perkembangan *Aeromonas hydrophila* pada berbagai media kultur. *Seminar Nasional Ke-III: Hasil-hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan*.

Hadiwiyoto, S. Hubungan keadaan kimiawi dan mikrobiologik ikan pindang naya pada penyimpanan suhu kamar dengan sifat organoleptiknya. *Agritech*. **15** (1): 19—23.

Hamny, Zulfan, M., Abrar, M., Dewi, M., Darmawi, Daud, R., dan Panjaitan, B. 2019. Isolation and identification of *Aeromonas* sp. in goldfish (*Carrasius auratus*) from several pet shops in Banda Aceh. *Jurnal Medika Veterinaria*. **13** (1): 72—78.

Hasan, B., Desmelati, Iriani, D., Nugroho, T., Arifin, M. A., dan Syatapahana, A. 2015. Aktivitas enzim protease dan lipase viscera ikan kembung (*Restrelliger* sp.) pada pH dan konsentrasi garam berbeda. *Berkala Perikanan Terubuk*. **43** (2): 68—76.

Hasanah, N. F., Pringgenies, D., dan Wulandari, S. Y. 2012. Karakteristik metabolit sekunder bakteri simbion gastropoda *Conus miles* dengan metode GC-MS sebagai antibakteri MDR (*Multi Drug Resistant*). *Journal of Marine Research.* **1** (2): 197—202.

Hernandez-Herrero, M.M. 2002. Influence of raw fish quality on some physicochemical and microbial characteristics as related to ripening of salted anchovies *(Engraulis encrasicholus L)*. *Journal Food Science*. **67** (7).

Huda, C., Salni, dan Meki. 2012. Penapisan aktivitas antibakteri dari bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak *Sarcophyton* sp. *Maspari Journal* **4** (1): 69—76.

Hutami, R., Haryati, W., Amalia, U., Rachmani, I. D., Tannia, N., dan Wirasuwasti, N. 2012. Analisis komponen asam lemak dalam minyak goreng dengan instrumen GC-MS (*Gass Chromatography-Mass Spectrometer*). *Food Science and Technology*.

Ismail, Jailani, dan Adnan. 2014. Studi hasil tangkapan ikan bubu dasar di daerah perairan rawa kecamatan marang kayu Kabupaten Kutai Kartanegara. *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis.* **19** (2): 14—22.

Ismiyarto, Halim, S. A., dan Wibawa, P. J. 2006. Identifikasi komposisi asam lemak dari minyak benih turi (*Sesbania grandiflora* (L) Pers). *J. Kim. Sains & Apl.* **IX** (1).

Istikhanah, Sarjito, dan Prayitno, S. B. 2014. Pengaruh pencelupan ekstrak daun sirih temurose (*Piper betle linn*) terhadap mortalitas dan histopatologi ginjal ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. **3** (3): 51—57.

Iswanto, B. dan Suprapto, R. 2015. Abnormalitas morfologis benih ikan lele afrika (*Clarias gariepinus*) strain mutiara. *Media Akuakultur*. **10** (2): 51—57.

Janda, J. M. and Abbott, S. L. 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*. **23** (1): 35—73.

Jayani, A., Efendi, Z., dan Silsia, D. 2016. Kajian sifat fisik dan sensoris dendeng lele hasil restrukturisasi daging ikan lele dengan penambahan sagu. *Jurnal Agroindustri.* **4** (2): 55—64.

Jusman, Setiaji, B., Triyono, dan Syoufian, A. 2018. Pengaruh variasi waktu dan kecepatan pengadukan dalam pembuatan etil ester dari minyak kelapa. *KOVALEN.* **4** (1):106—114.

Kaimudin, M. 2014. Pengaruh penambahan bumbu terhadap mutu ikan asin kering. *Majalah Biam.* **10** (2): 76—82.

Kamal, S., Nurliana, Jamin, F., Sulasmi, Hamny, dan Fakhrurrazi. 2016. Total bakteri psikotropik ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diberi peningkatan suhu pada saat pemeliharaan. *Jurnal Medika Veterinaria*. **10** (1): 37—40.

Karantina Ikan dan Pengendalian Mutu. 2018. Pembacaan Hasil Uji Biokimia. BKIPM. Yogyakarta.

KIPM. www.bkipm.kkp.go.id. Diakses pada tanggal 8 Mei 2019.

Kismiyati, S. Subekti, R.W.N. Yusuf, dan R. Kusdarwati. 2009. Isolasi dan identifikasi bakteri gram negatif pada luka ikan maskoki (*Carassius auratus*) akibat infestasi ektoparasit *Argulus* sp. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan.* **1** (2): 129—134.

Krzyminska, S., Mokracka, J., Koczura, R., Cwiertnia, A., and Kaznowski, A. 2012. *Aeromonas* spp.-mediated cell-contact cytotoxicity is associated with the

presence type III secretion system. *Antonie van Leeuwenhoek*. **101**: 243—251.

Kumar, R., Pande, V., Singh, L., Sharma, L., Saxena, N., Thakurla, D., Singh, A. K., and Sahoo, P. K. 2016. Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in golden mahseer (*Tor putitora*). *Fisheries and Aquaculture Journal*. **7** (1): 1—6.

Kurniawan, A., Wirasembada, Y. C., Razaad, I. M. N., Novriansyah, A., Rafi, M., dan Effendi, A. J. 2018. Hidrokarbon aromatik polisiklik pada lahan tercemar limbah minyak bumi: tinjauan pertumbuhan mikroorganisme, proses metabolisme dan biodegradasi. *Jurnal Ilmu Lingkungan*. **16** (1): 9—24.

Laith, A. R. dan Najiah, M. 2013. *Aeromonas hydrophila*: Antimicrobial susceptibility and histopathology of isolates from diseased catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Journal of Aquaculture*. **5** (2): 1—7.

Lindawati, S. A. dan Suardana, I. W. 2016. Isolasi dan identifikasi spesies bakteri asam laktat penghasil senyawa antimikrob asal kolon sapi Bali. *Jurnal Veteriner*. **17** (4): 576—581.

Listyarini, S., Asriani, dan Santoso, J. 2018. Konsentrasi protein ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) afkir dalam kerupuk melarat untuk mencapai *sustainable development goals. Jurnal Matematika, Sains, dan Teknologi.* **19** (2): 106—113.

Lukistyowati, I. dan Kurniasih. 2012. Pelacakan gen *aerolysin* dari *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas yang diberi pakan ekstrak bawang putih. *Jurnal Veteriner*. **13** (1): 43—50.

Mac Faddin, Jean F., MS, MT (ASCP), SM (AAM), SFC, USA retired. 1983. *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*. Second Edition. Williams & Wilkins. Baltimore/London.

Machmud, M. 2001. Teknik penyimpanan dan pemeliharaan mikroba. *Buletin AgroBio.* **4** (1): 24—32.

Maishela, B., Suparmono, Diantari, R., dan Muhaemin, M. 2013. Pengaruh fotoperiode terhadap pertumbuhan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). *e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. **1** (2): 145—150.

Manduapessy, K. R. W. 2017. Profil asam lemak ikan layang segar (*Decapterus macrosoma*). *Majalah BIAM*. **13** (01): 42—46.

Mangunwardoyo, W., Ismayasari, R., dan Riani, E. 2009. Aktivitas kitinase, lesitinase, dan hemolisin isolat dari bakteri ikan nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) yang dikultur dalam keramba jaring apung Waduk Jatiluhur, Purwakarta. *J. Ris. Akuakultur.* **4** (2): 2557—265.

_____. 2010. Uji patogenitas dan virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier pada ikan nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) melalui postulat koch. *J. Ris. Akuakultur.* **5** (2): 245—255.

Marlina, Wijayanti, D., Yudiastari, I. P., dan Safitri, L. 2017. Pembuatan *virgin coconut oil* dari kelapa hibrida menggunakan metode penggaraman dengan NaCl dan garam dapur. *Jurnal Chemurgy*. **1** (2): 1—6.

Moelyanto. 1986. Pengolahan Ikan untuk Indonesia. Dewan Pimpinan Pusat Ikatan Nelayan Indonesia (NELPAN). Jakarta.

Muslikha, Pujiyanto, S., Jannah, S. N., dan Novita, H. 2016. Isolasi, karakterisasi *Aeromonas hydrophila* dan deteksi gen penyebab penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) dengan 16s *rRNA* dan *aerolysin* pada ikan lele (*Clarias* sp.). *Jurnal Biologi.* **5** (4): 1—7.

Nainggolan, B., Susanti, N., dan Juniar, A. 2016. Uji kelayakan minyak goreng curah dan kemasan yang digunakan menggoreng secara berulang. *Jurnal Pendidikan Kimia*. **8** (1): 45—57.

NCBI. 2019. https://www.ncbi.nlm.nih.gov. Diakses pada tanggal 7 Mei 2019.

Ngadiarti, I., Kusharto, C. M., Briawan, D., Marliyati, S. A., dan Sayuthi, D. 2013. Kandungan asam lemak dan karakteristik fisiko-kimia minyak ikan lele dan minyak ikan lele terfermentasi. *Penelitian Gizi dan Makanan*. **36** (1): 82—90.

Ningtyas, D. P., Budhiyanti, S. A., dan Sahubawa, L. 2013. Pengaruh katalis basa (NaOH) pada tahap reaksi transesterifikasi terhadap kualitas biofuel dari minyak tepung ikan sardin. *Jurnal Teknosains.* **2** (2): 71—158.

Noor, J. 2016. Metodologi Penelitian: Skripsi, Tesis, Disertasi, dan Karya Ilmiah. Prenada Media.

Novilla, A., Nursidika, P., dan Mahargyani, W. 2017. Komposisi asam lemak minyak kelapa murni (*virgin coconut oil*) yang berpotensi sebagai anti kandidiasis. *EduChemia*. **2** (2).

Novitasari, M. R., Febrina, L., Agustina, R., Rahmadani, A., dan Rusli, R. 2016. Analisis GC-MS senyawa aktif antioksidan fraksi etil asetat daun libo (*Vicus variegata Blume.*). *Jurnal Sains dan Kesehatan.* **1** (5): 221—225.

Nugroho, M. F. A. dan Murtini, E. S. 2017. Inovasi peningkatan kandungan gizi jajanan tradisional klepon dengan modifikasi bahan dan warna. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **5** (1): 92—103.

Nurasmi, Sari, A. P., dan Rusmiati. 2018. Analisis kandungan asam lemak omega 3, omega 6 dan omega 9 dari ikan lele (*Clarias* sp.) pada peningkatan nutrisi balita. *Jurnal of Borneo Holistic Health*. **1** (1): 96—100.

Octaviana, H. N., Sasanti, A. D., dan Fitriani, M. 2015. Pencegahan infeksi *Aeromonas hydrophyla* pada ikan lele sangkuriang menggunakan tepung buah mahkota dewa dalam pakan. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*. **3** (2): 14—24.

Olga dan Fatmawaty. 2012. Efikasi rute vakin *Aeromonas hydrophila* ASB-01 pada ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*). *Fish Scientiae*. **4** (6):131—144.

Olgunoglu, I. A. 2017. Review on omega-3 (n-3) fatty acids in fish and seafood. *Journal of Biology, Agriculture, and Healthcare*. **7** (12): 37—45.

Panagan, A. T., Yohandini, H., dan Wulandari, M. 2012. Analisis kualitatif dan kuantitatif asam lemak tak jenuh omega-3, omega-6, dan karakterisasi minyak ikan patin (*Pangasius pangasius*). *Jurnal Penelitian Sains*. **15** (3): 102—106.

Panagan, A. T., Yohandini, H., dan Wulandari, M. 2012. Analisis kualitatif dan kuantitatif asam lemak tak jenuh omega-3, omega-6 dan karakterisasi minyak ikan patin (*Pangasius pangasius*). *Jurnal Penelitian Sains.* **15** (3): 103—106.

Pandiangan, M., Kaban, J., Wirjosentono, B., dan Silalahi, J. 2019. Analisis kandungan asam lemak omega 3 dan omega 6 pada minyak ikan mas (*Cyprinus carpio*). *ST Conference.* **2** (1): 37—44.

Pangestuti, D. R. dan Rohmawati, S. 2018. Kandungan peroksida minyak goreng pada pedagang gorengan di wilayah Kecamatan Tembalang Kota Semarang. *Amerta Nutr.* 205—211.

Pianetti, A., Manti, A., Boi, P., Citterio, B., Sabatini, L., Papa, S., Rocchi, M. B. L., and Bruscolini, F. 2008. Determination of viability of *Aeromonas hydrophila* in increasing concentrations of sodium chloride at different temperatures by flowcytometry and plate count technique. *International Journal of Microbiology*. **127**: 252—260.

Pradina, E. L. 2012. Aplikasi metode GC-MS untuk penetapan kadar residu profenofos pada buah stroberi (*Fragaria* sp.) setelah pencucian. *Naskah Publikasi*.

Prahesty, F. D., Maulana, I. T., dan Dasuki, U. A. 2017. Profil kandungan asam lemak ikan nilem (*Osteochillus hasselti*) dan ikan gabus (*Channa striata*) menggunakan kromatografi gas spektroskopi massa. *Prosiding Farmasi*. **3** (2): 407—414.

Prahesty, F. D., Maulana, I. T., dan Dasuki, U. A. Profil kandungan asam lemak ikan nilem (*Osteochillus hasselti*) dan ikan gabus (*Channa striata*) menggunakan kromatografi gas spektrofotometri massa. *Prosiding Farmasi*.

Pranowo, D. dan Muchalal, M. 2004. Analysis of free fatty acid in soybean oil using gass chromatography-mass spectroscopy. *Indonesian Journal of Chemistry*. **4** (1): 62--67.

Prasetya, N. B. A. dan Ngadiwiyana. 2006. Identifikasi senyawa penyusun minyak kulit batang kayu manis (*Cinnamomum cassia*) menggunakan GC-MS. *J. Kim. Sains.* **10** (3): 81—83.

Prasetya, R. R., Poetranto, E. D., dan Handijatno, D. 2017. Identifikasi gen *aerolysin* dan sensitivitas antibiotik *Aeromonas hydrophila* penyebab kematian tukik (*Lepidochelys olivacea*) di Pulau Serangan, Bali. *Jurnal Veteriner*. **18** (2): 201—206.

Prayogi, Y. T., Kusdarwati, R., dan Kismiyati. 2016. Isolasi, identifikasi, dan presentasi ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* yang dipelihara di keramba jaring apung di Bozem

Moro Krembengan, Surabaya. *Journal of Aquaculture and Fish Health.* **5** (2): 22—27.

Prijana dan Rohman, A. S. 2016. Studi eksperimen mengenai metode baca *good reading*. *Lentera Pustaka.* **2** (2): 71—81.

Puspaningsih, N.N.T., Suwito, H., Sumarsih, S., Rohman, A., dan Asmarani, O., 2007. Hidrolisis beberapa xilan dengan enzim xilanolitik termofilik rekombinan. *Berk. Pen. Hayati*. **12**. 191-194

Qomari, R. 2009. Teknik penelusuran analisis data kuantitatif dalam penelitian kependidikan. *Jurnal Pemikiran Alternatif Kependidikan*. **14** (3): 527—539.

Rahmaningsih, S. 2018. Hama dan Penyakit Ikan. Deepublish: Yogyakarta.

Rejeki, S., Triyanto, dan Murwantoko. 2016. Isolasi dan identifikasi *Aeromonas* spp. dari lele dumbo (*Clarias* sp.) sakit di kabupaten ngawi. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada* **18** (2): 55—60.

Rossita, A. S., Munandar, K., dan Komarayanti, S. 2017. Komparasi media NA pabrikan dengan NA modifikasi untuk media pertumbuhan bakteri. *Seminar Nasional Biologi, IPA, dan Pembelajarannya*. 192—201.

Safrida, Y. D., Yulvizar, C., dan Devira, C. N. 2012. Isolasi dan karakterisasi bakteri berpotensi probiotik pada ikan kembung (*Restrelliger* sp.). *Depik*. **1** (3): 200—203.

Sahriawati dan Daud, A. 2016. Optimasi proses ekstraksi minyak ikan metode soxhletasi dengan variasi jenis pelarut dan suhu berbeda. *Jurnal Galung Tropika*. **5** (3): 164—170.

Salasah, R. dan Nilawati, M. J. 2016. Kajian peningkatan asam lemak omega-3 EPA dan DHA pada minyak ikan lele yang diberi pakan minyak kacang kedelai. *e-Jurnal Mitra Sains.* **4** (2): 1—12.

Salindeho, N. 2017. Karakteristik fisiko kimia, profil asam lemak ikan cakalang asap menggunakan bahan pengasap sabut kelapa dan cangkang pala. *JPHPI*. **20** (2): 392—400.

Salosa, Y. Y. 2013. Uji kadar formalin, kadar garam, dan total bakteri ikan asin tenggiri asal Kabupaten Sarmi Provinsi Papua. *Depik*. **2** (1): 10—15.

Samosir, M. F., Suryanto, D., dan Desrita. 2017. Isolasi dan identifikasi bakteri potensial probiotik pada saluran pencernaan ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Aquacoastmarine.* **15** (1): 1—14.

Samsundari, S. 2006. Pengujian ekstrak temulawak dan kunyit terhadap resistensi bakteri *Aeromonas hydrophila* yang menyerang ikan mas (*Cyprinus carpio*). *GAMMA*. **2** (1): 71—83.

Santika. 2016. Pengukuran tingkat kadar lemak tubuh melalui *jogging* selama 30 menit mahasiswa putra semester IV FPOK IKIP PGRI Bali. *Jurnal Pendidikan Kesehatan Rekreasi*. **1**: 89—98.

Sappu, E. E. B., Handayani, D., dan Rahmi, Y. 2014. Pengaruh substitusi tepung terigu dengan tepung daun turi (*Sesbania grandiflora*) terhadap mutu daging nabati. *Indonesian Journal of Human Nutrition*. **1** (2): 114—127.

Sardiani, N., Litaay, M., Budji, R. G., Priosambodo, D., Syahribulan, dan Dwyana, Z. 2015. Potensi tunikata *Rhopalaea* sp. sebagai sumber inokulum bakteri endosimbion penghasil antibakteri; 1. Karakterisasi isolat. *Jurnal Alam dan Lingkungan*. **6** (11): 1—10.

Sari, R. A., Nofiani, R., dan Ardianingsih, P. 2012. Karakterisasi bakteri asam laktat genus *Leuconostoc* dari pekasam ale-ale hasil formulasi skala laboratorium. *JKK*. **1** (1): 14—20.

Sartika, R. A. D. 2008. Pengaruh asam lemak jenuh, tidak jenuh, dan asam lemak trans terhadap kesehatan. *Jurnal Kesehatan Masyarakat Nasional.* **2** (4): 154—160.

Scharlau. 2019. Tryptic Soy Broth (TSB) (Eur. Pharm). www.scharlabmagyarorszag.hu. Diakses pada 3 April 2019.

Setiaji, J., Johan, T. I., dan Widantari, M. 2015. Pengaruh gliserol pada media *tryptic soy broth* (tsb) terhadap viabilitas bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Dinamika Pertanian.* **30** (1): 83—92.

Setiawati, T., Atmomarsono, U., dan Dwiloka, B. 2016. Kadar lemak dan profil asam lemak jenuh, asam lemak tak jenuh daging ayam broiler dengan pemberian pakan mengandung tepung daun kayambang (*Salvinia molesta*). *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. **9** (2): 1—8.

SNI 2729.2013. Ikan Segar. Badan Standarisasi Nasional.

SNI 01-2354.3-2006. https://id.scribd.com/. Diakses pada tanggal 8 Mei 2019.

SNI 2332.3:2015. www.bkipm.kkp.go.id. Diakses pada tanggal 8 Mei 2019.

SNI 2332.9:2011. www.bkipm.kkp.go.id. Diakses pada tanggal 8 Mei 2019.

Soehono, L. A. 2016, Pengantar Perancangan Percobaan. UB Press. Malang. 50 hlm.

Soeleman, S. 2014. Analisa kadar lemak pada ikan lele (*Clarias* sp.) yang dibudidayakan dan tidak dibudidayakan yang dijual di Kota Makassar. *Media Analisis*. **5** (1): 1—8.

Soetjipto, H., Anggreini, T., dan Cahyanti, M. N. 2018. Profil asam lemak dan karakterisasi minyak biji labu kuning (*Cucurbita moschata* D.). *Jurnal Kimia dan Kemasan*. **40** (2): 79—86.

Sri R. 2004. *Kerusakan Oksidatif pada Makanan*. Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Srimiati, M., Kusharto, C. M., Tanziha, I., dan Suseno, S. H. 2017. Konsumsi minyak ikan lele (*Clarias gariepinus*) yang diperkaya omega-3 memperbaiki *Low Density Lipoprotein* (LDL) dan kolesterol total pada lansia. *Jurnal Gizi Pangan*. **12** (2): 117—122.

Suhardjo dan Kusharto, C. M. 1992. Prinsip-prinsip Ilmu Gizi. Kanisius. Yogyakarta.

Sukarsa, D. R. 2004. Studi aktivitas asam lemak omega-3 ikan laut pada mencit sebagai model hewan percobaan. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*. **7** (1): 68—79.

Sumbono, A. 2016. Biokimia Pangan Dasar. Deepublish. Yogyakarta.

Suratno dan Utomo, R. V. 2018. Bilangan peroksida pada minyak goreng penjual gorengan di Jalan Rajawali Kota Palangka Raya. *Borneo Journal of Medical Laboratory Technology*. **1** (1): 25—29.

Suryaningrum, T. D., Syamdidi, dan Rizki, E. M. 2013. Penggunaan berbagai garam dan bumbu pada pengolahan pindang ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). *JPB Kelautan dan Perikanan.* **8** (1): 23—34.

Suwarno, Y. F., Sarjito, dan Prayitno, S. B. 2014. Sensitivitas bakteri yang berasosiasi dengan penyakit ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) terhadap berbagai macam obat ikan yang beredar di Kabupaten Pati. *Journal of Aquaculture*. **3** (4): 134—141.

Suyanto, S. R. 2007. Budi Daya Ikan Lele. Penebar Swadaya. Jakarta. 19 hlm.

Swandi, M. K., Periadnadi, dan Nurmiati. 2015. Isolasi bakteri pendegradasi limbah cair industri minyak sawit. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. **4** (1): 71—76.

Syauqi, A. 2017. Penentuan kuantitas sel *Saccharomyses cerevisiae* dengan turbidimetri. *e-Jurnal Ilmiah Biosaintropis (Bioscience-Tropic*). **2** (2): 1—9.

Tangguda, S., Arfiati, D., dan Ekawati, A. W. 2015. Karakterisasi limbah padat tambak udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) untuk kultur murni *Chlorella* sp. *Procedings Seminar Nasional*. **5**: 381—386.

Thariq, A. S., Swastawati, F. dan Surti, T. 2014. Pengaruh perbedaan konsentrasi garam pada peda ikan kembung (*Rastrelliger neglectus*) terhadap kandunan asam glutamat pemberi rasa gurih (*umami*). *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan.* **3** (3): 104—111.

Triyaningsih, Sarjito, dan Prayitno, S. B. 2014. Patogenitas *Aeromonas hydrophila* yang diisolasi dari lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang berasal dari Boyolali. *Journal of Aquaculture Management and Technology.* **3** (2): 11—17.

Tumbelaka, R. A., Naiu, A. S., dan Dali, F. A. 2013. Pengaruh konsentrasi garam dan lama penggaraman terhadap nilai hedonik ikan bandeng (*Chanos chanos*) asin kering. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan.* **1** (1): 48—54.

Tuminah, S. 2009. Efek asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh “trans” terhadap kesehatan. *Media Peneliti dan Pengembangan Kesehatan.* 19: 13—20.

Ubadillah, A. dan Hersoelistyorini, W. 2010. Kadar protein dan sifat organoleptik nugget rajungan dengan substitusi ikan lele (*Clarias gariepinus*). *Jurnal Pangan dan Gizi*. **01** (02): 45—54.

Umar, F. Biodegradasi petroleum dan hidrokarbon eikosana oleh isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Al-Kimia.*

Vivekanandhan, G., Savithamani, K., and Lakshmanaperumalsamy, P. 2003. Influence of pH, salt concentration and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *J. Environ. Biol.* **24** (4): 373—379.

Wahjuningrum, D., E.H. Solikhah, T. Budiardi, dan M. Setiawati. Pengendalian infeksi *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele dumbo (*Clarias* sp.) dengan campuran meniran (*Phyllanthus niruri*) dan bawang putih (*Allium sativum*) dalam pakan. 2010. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **9** (2): 93—103.

Wibawa, P. J., Listiyorini, D., dan Fachriyah, E. 2006. Penentuan komposisi asam lemak ekstrak minyak ikan kembung (*Restrelliger kanagurta*) dengan Gc-Ms dan uji toksisitasnya menggunakan metode bslt. *Jurnal Sains dan Matematika.* **14** (4): 169—174.

Widodo, E. P. 2009. Tingkah laku makan lele sangkuriang *(Clarias gariepinus* Var. *Sangkuriang)* terhadap beberapa jenis anak ikan. Tesis. Universitas Indonesia.

Winarno, F.G. 2000. Kimia Pangan dan Gizi. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Yanuhar, U. 2009. Pengaruh pemberian bahan bahan aktif ekstrak *Nannochloropsis oculata* terhadap kadar radikal bebas pada ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) yang terinfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **1** (2): 1—13.

Yunita, M., Hendrawan, Y., dan Yulianingsih, R. 2015. Analisis kuantitatif mikrobiologi pada makanan penerbangan (*Aerofood ACS*) garuda Indonesia berdasarkan TPC (*Total Plate Count*) dengan metode *pour plate*. *Jurnal Keteknikan Pertanian Tropis dan Biosistem*. **3** (3): 237—248.

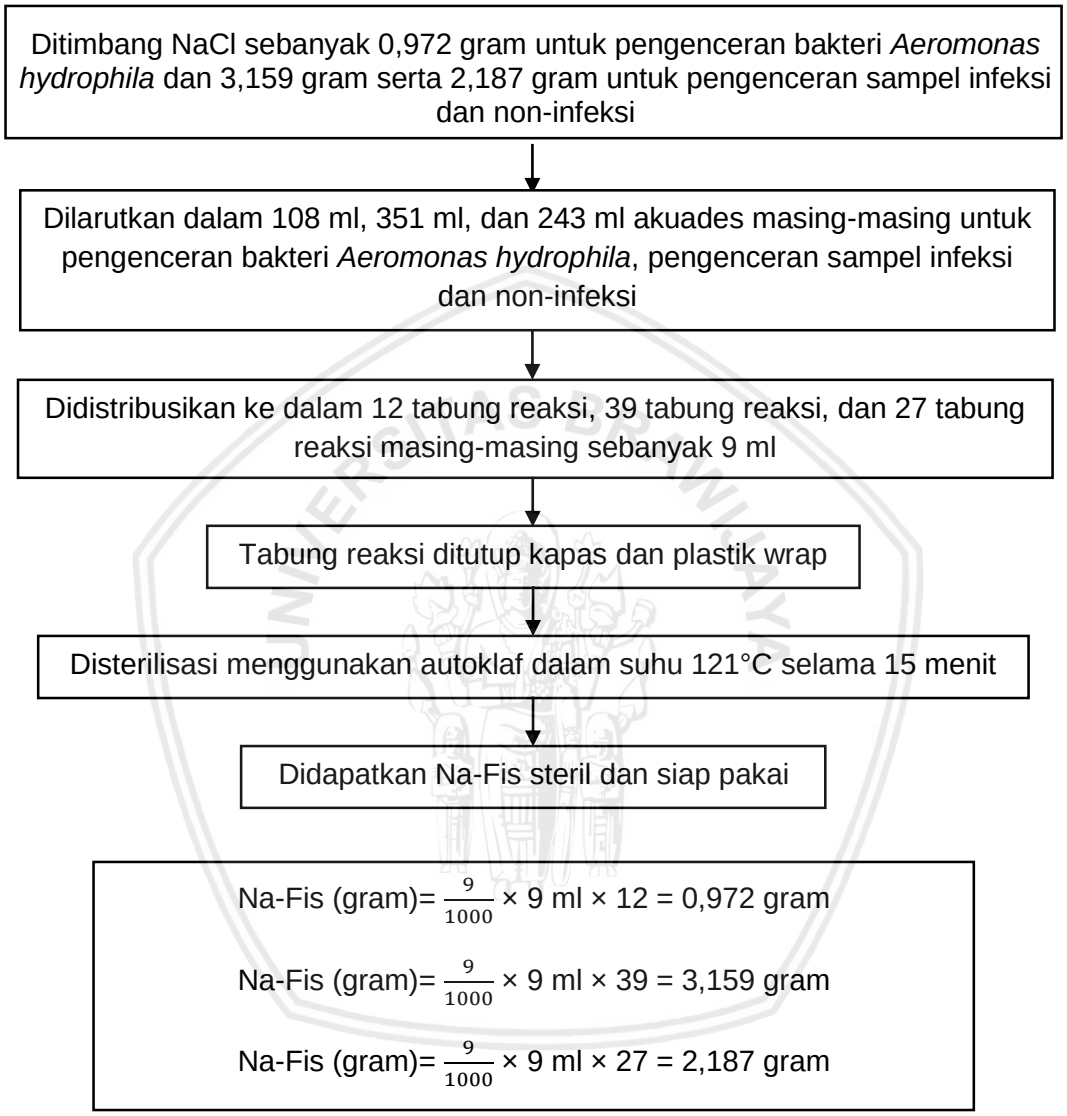
Yusmita, L. 2017. Identifikasi konsentrasi natrium klorida (NaCl) pada jahe dan lengkuas giling di beberapa pasar tradisional di Kota Padang. *Jurnal Teknologi Pertanian Andalas.* **21** (2): 122—126.

Yusriana, C. S., Budi, C. S., dan Dewi, B. T. 2014. Uji daya hambat daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Permata Indonesia*. **5** (2): 1—7.

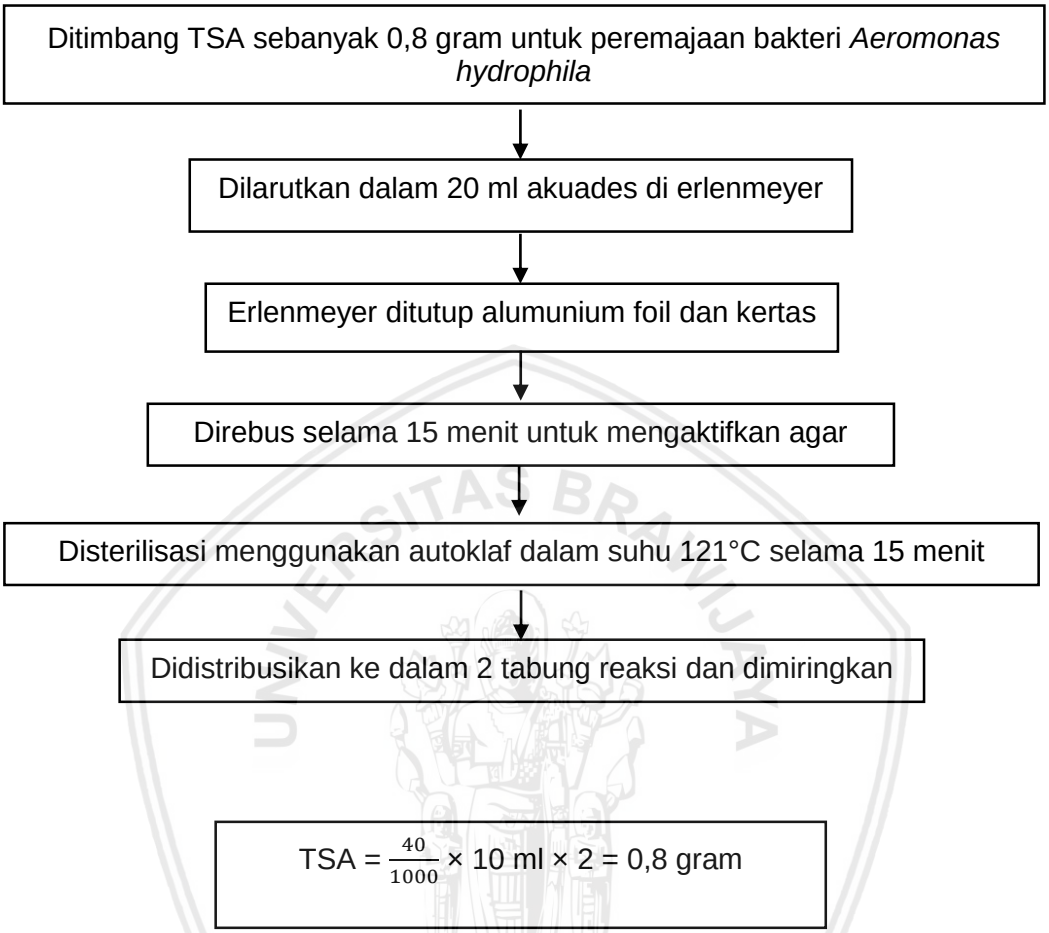
Zamani, N. P. dan Muhaemin, M. 2016. Penggunaan spektrofotometer sebagai pendeteksi kepadatan sel mikroalga laut. *Maspari Journal*. **8** (1): 39—48.

LAMPIRAN

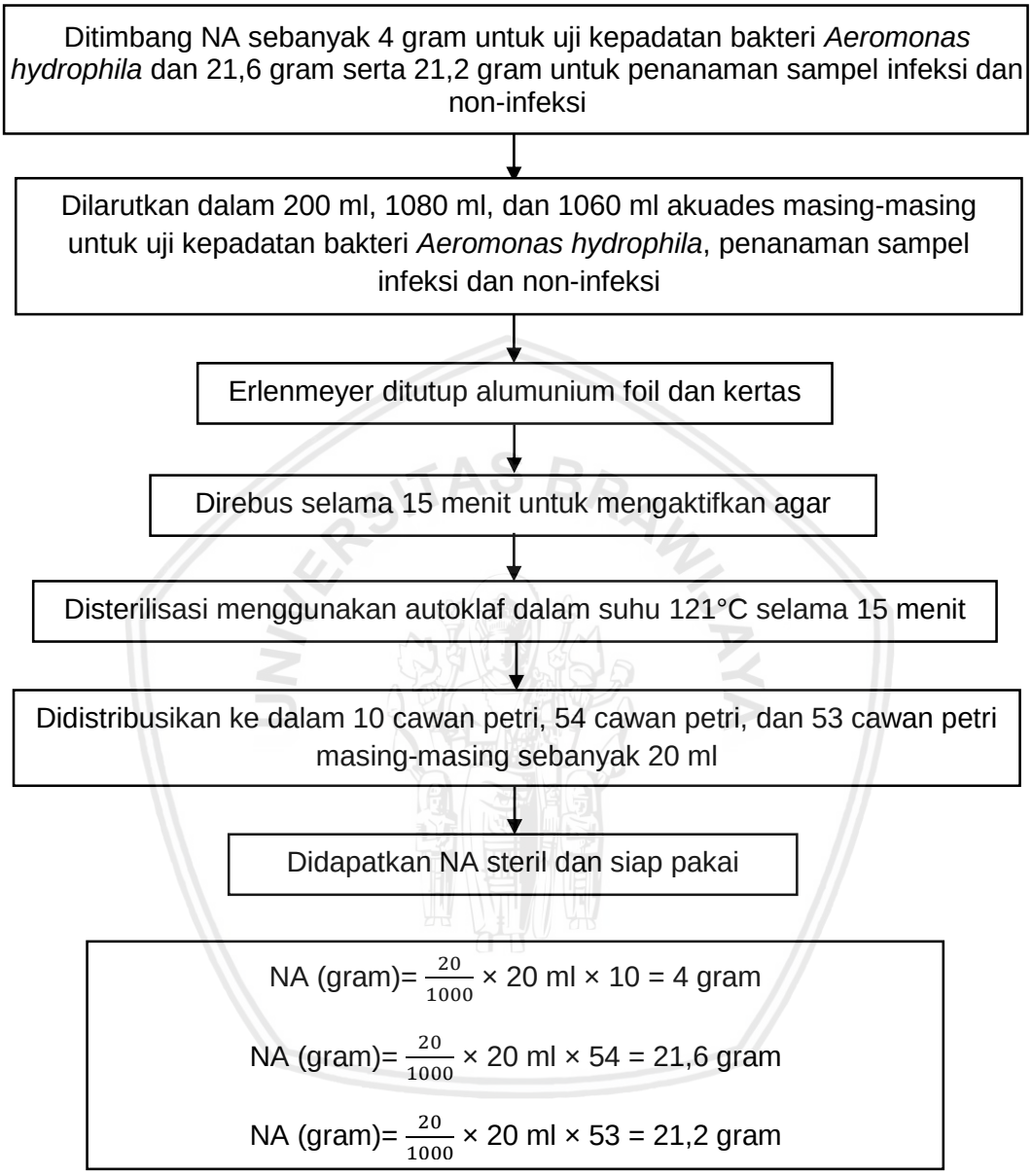
Lampiran 1. Pembuatan larutan Na-Fis



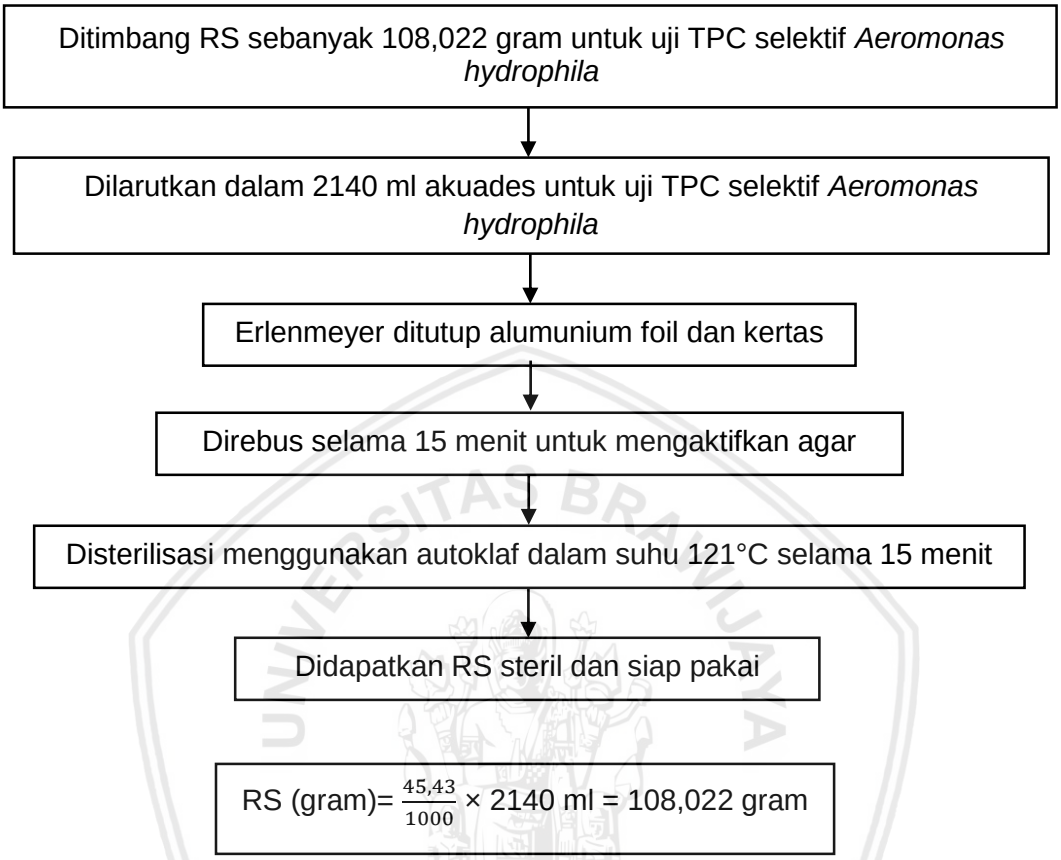
Lampiran 2. Pembuatan media TSA



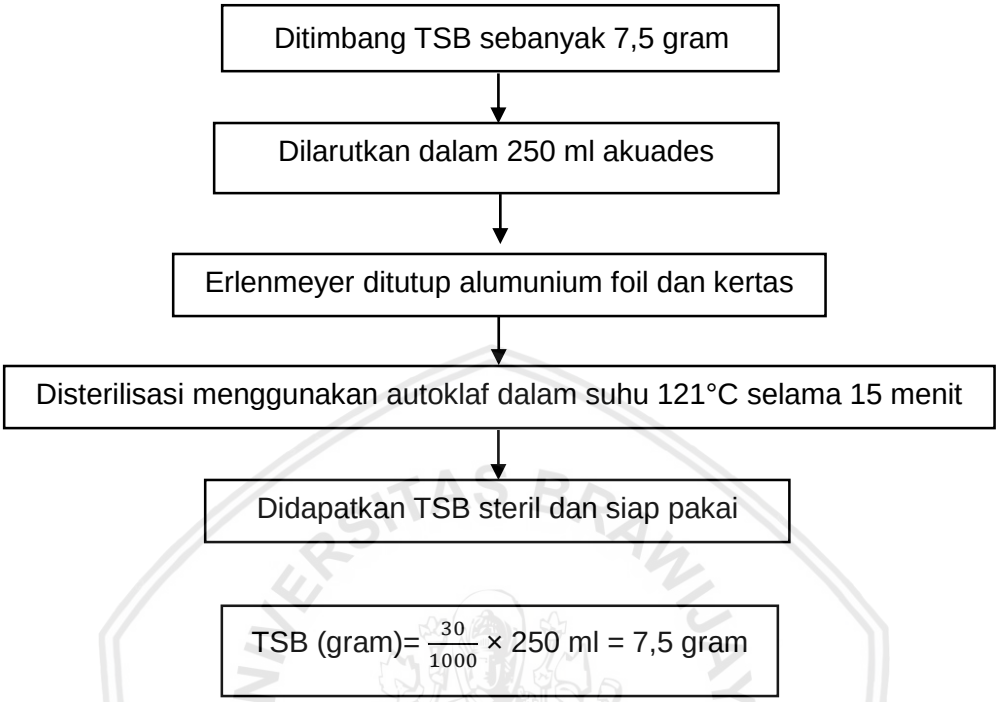
Lampiran 3. Pembuatan media NA



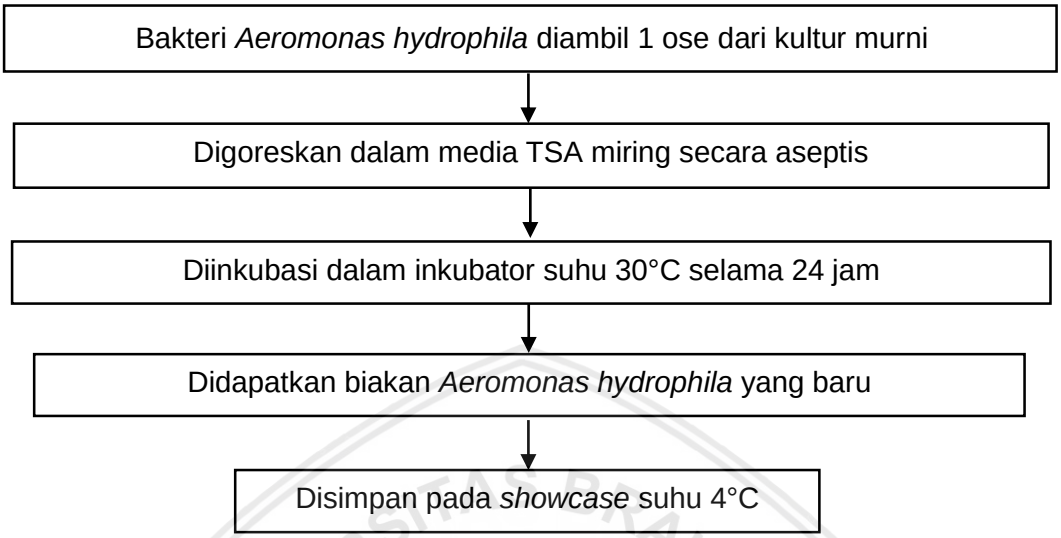
Lampiran 4. Pembuatan media RS



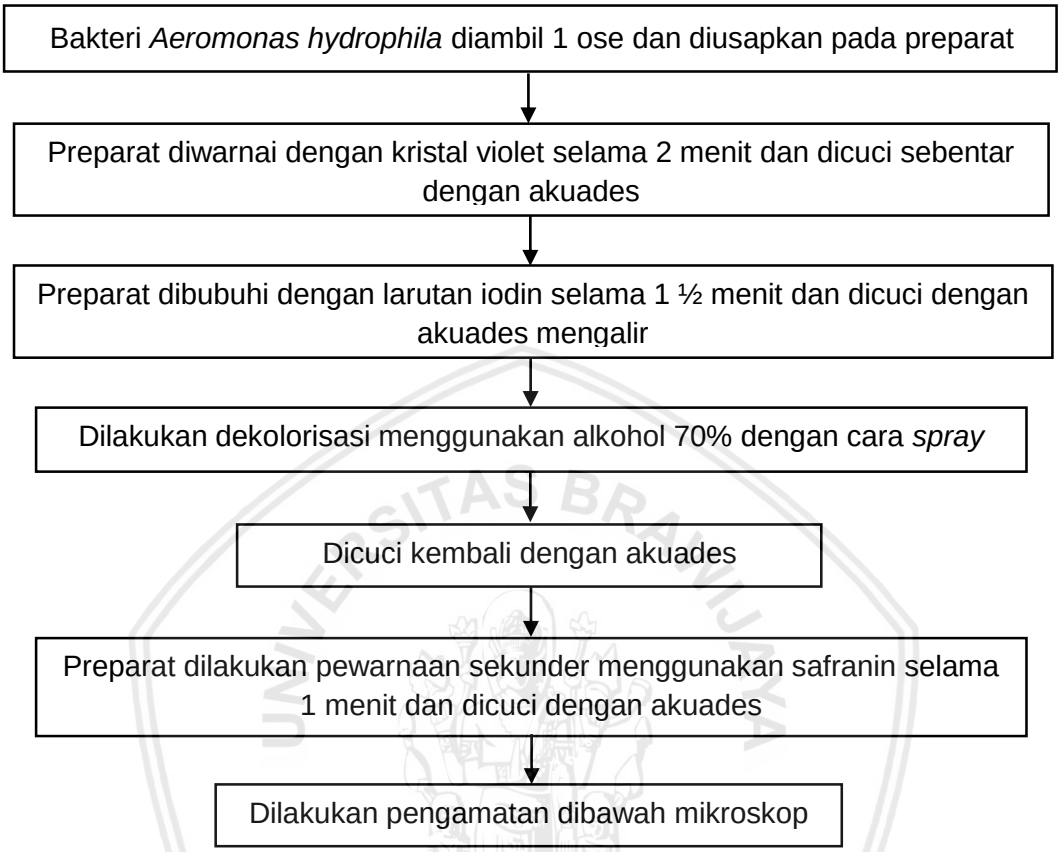
Lampiran 5. Pembuatan media TSB



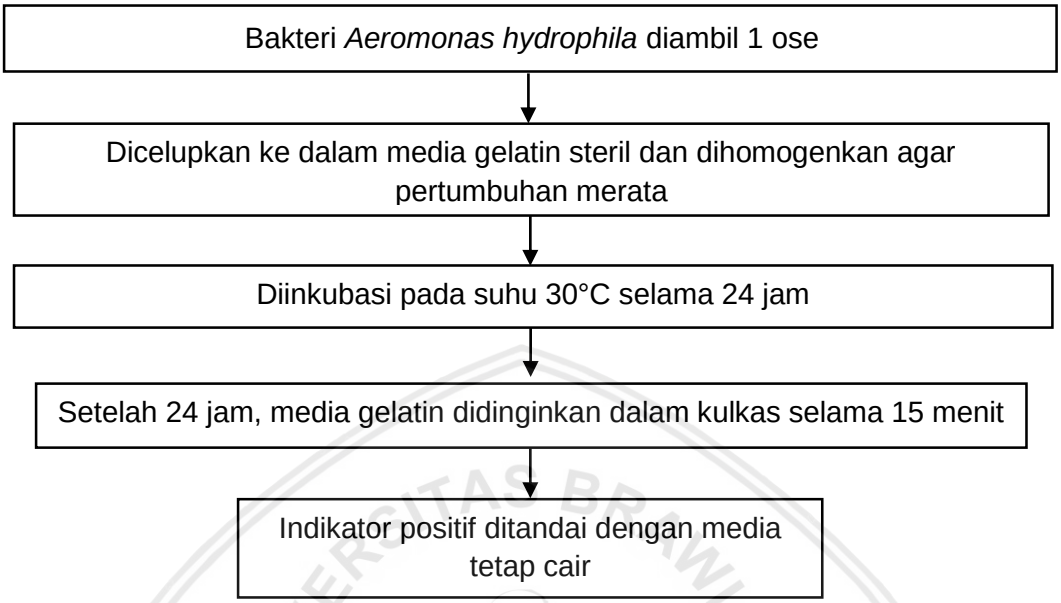
Lampiran 6. Peremajaan *Aeromonas hydrophila*



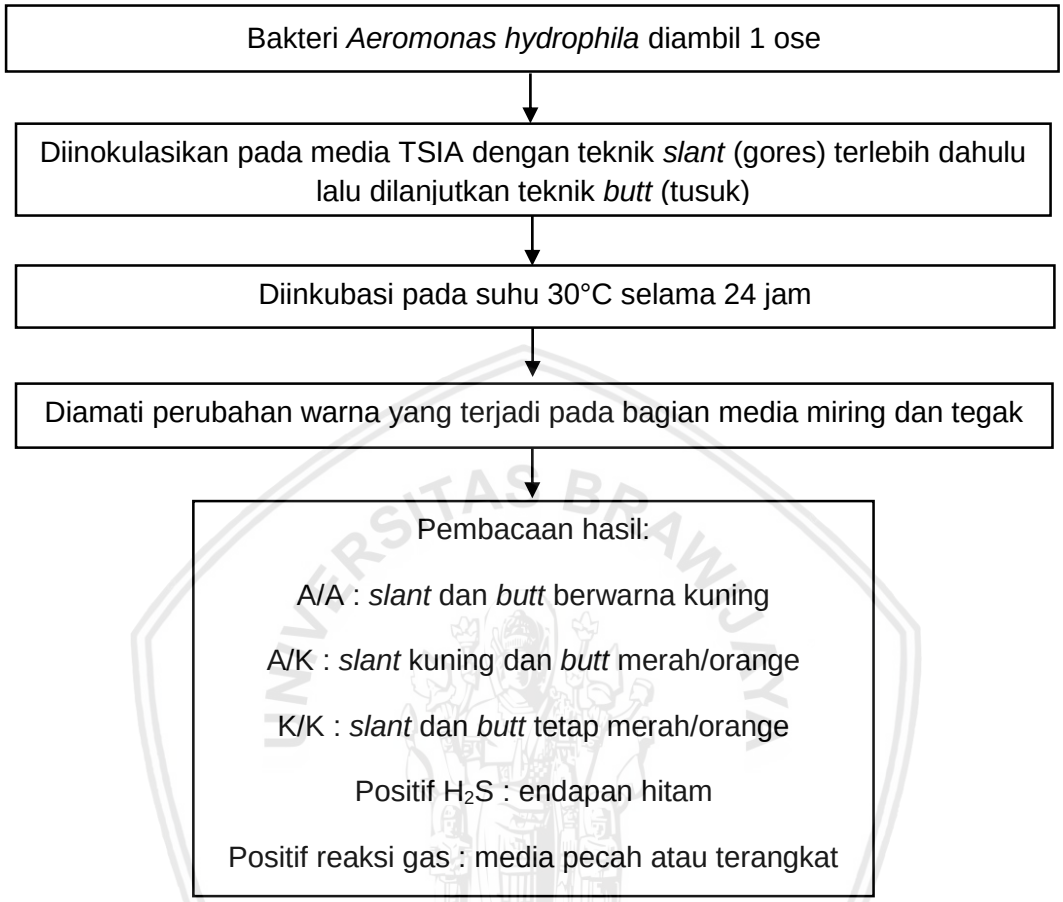
Lampiran 7. Pewarnaan gram dan pengamatan morfologi *Aeromonas hydrophila*



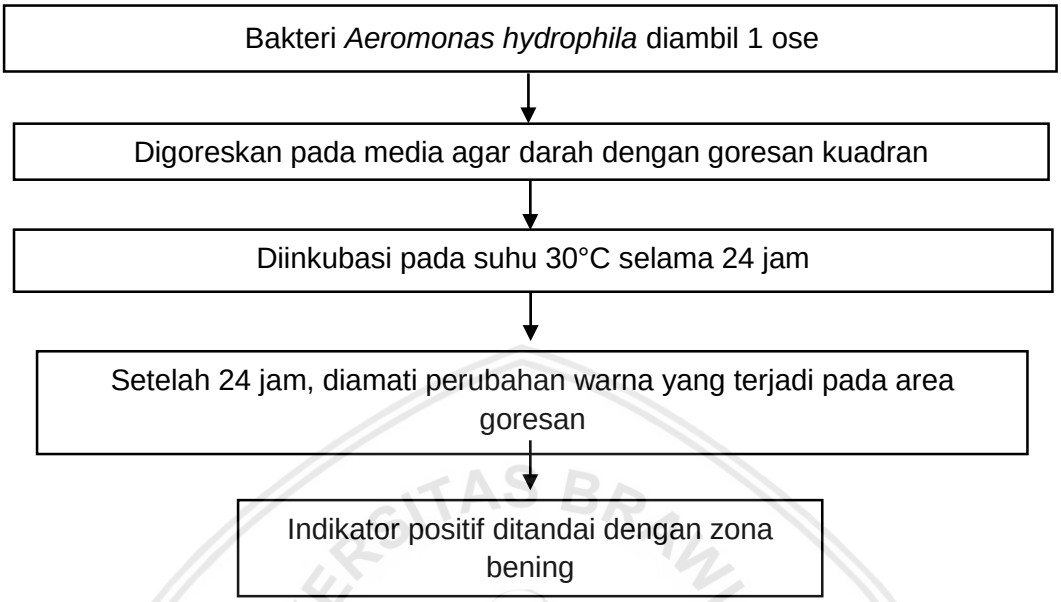
Lampiran 8. Uji gelatin *Aeromonas hydrophila*



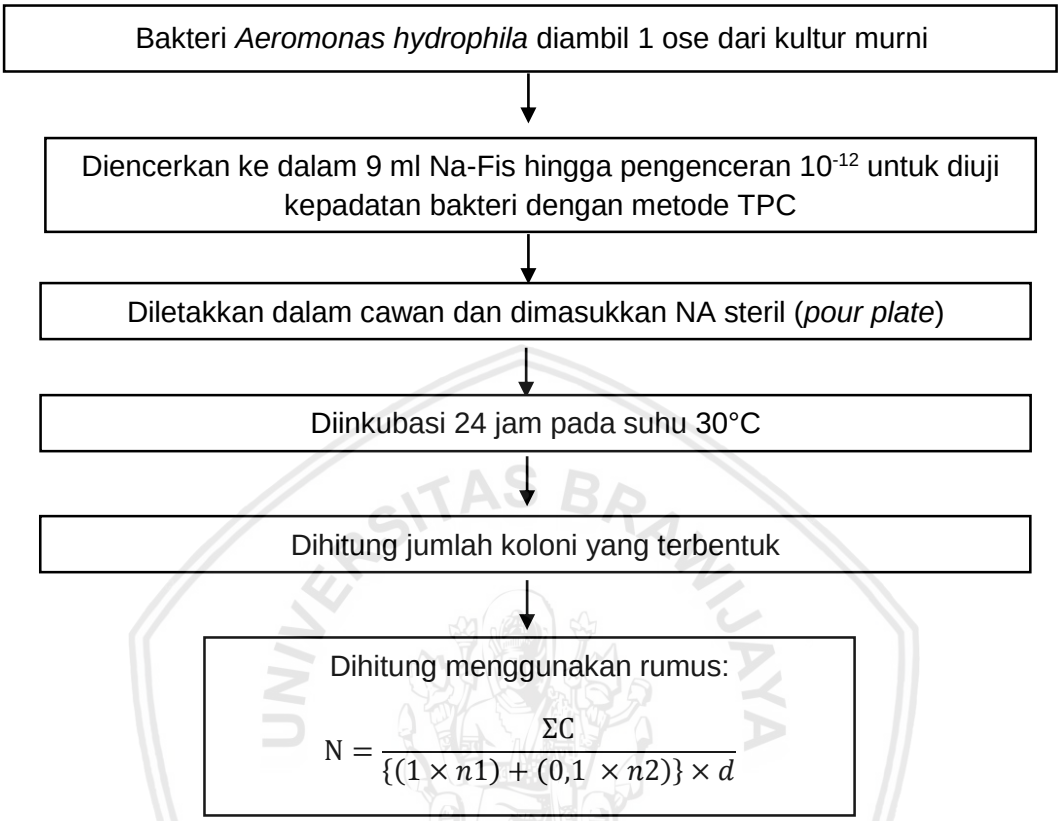
Lampiran 9. Uji TSIA *Aeromonas hydrophila*



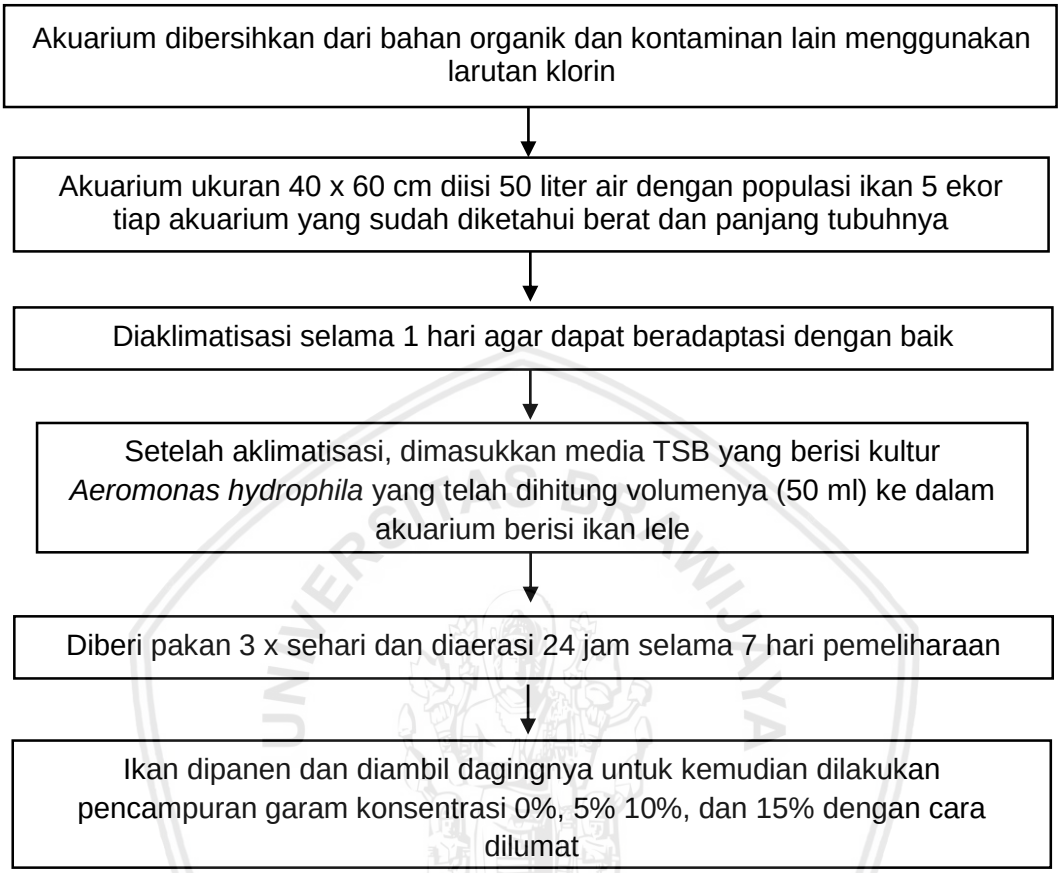
Lampiran 10. Uji hemolisin *Aeromonas hydrophila*



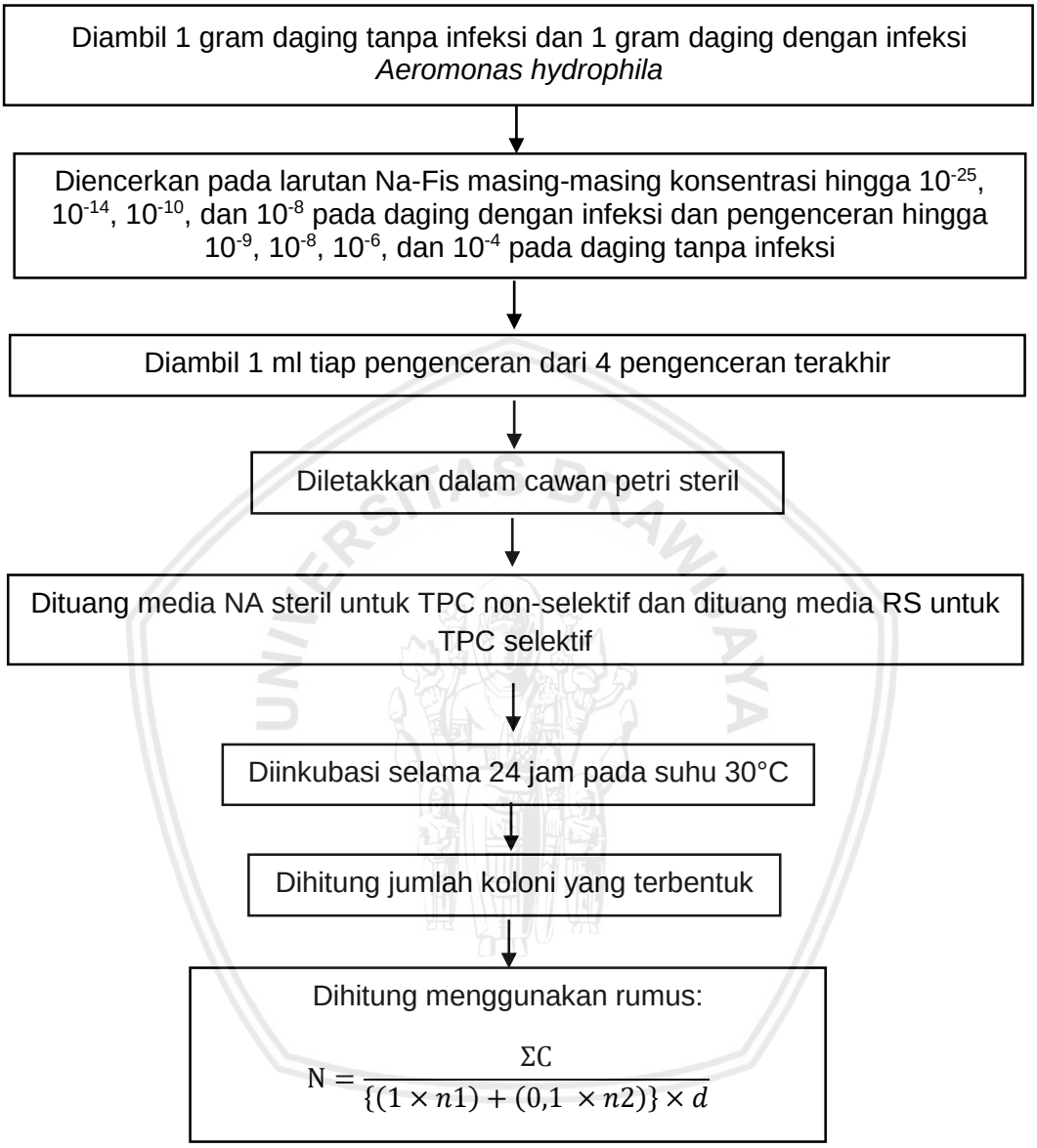
Lampiran 11. Uji kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila*



Lampiran 12. Infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele (*Clarias* sp.) dan perlakuan penambahan garam



Lampiran 13. Uji TPC (*Total Plate Count*)



Lampiran 14. Perhitungan TPC pada uji kepadatan bakteri

$$\mathrm{N} = \frac{\Sigma \mathrm{C}}{\{(1 \times n1) + (0{,}1 \times n2)\} \times d}$$

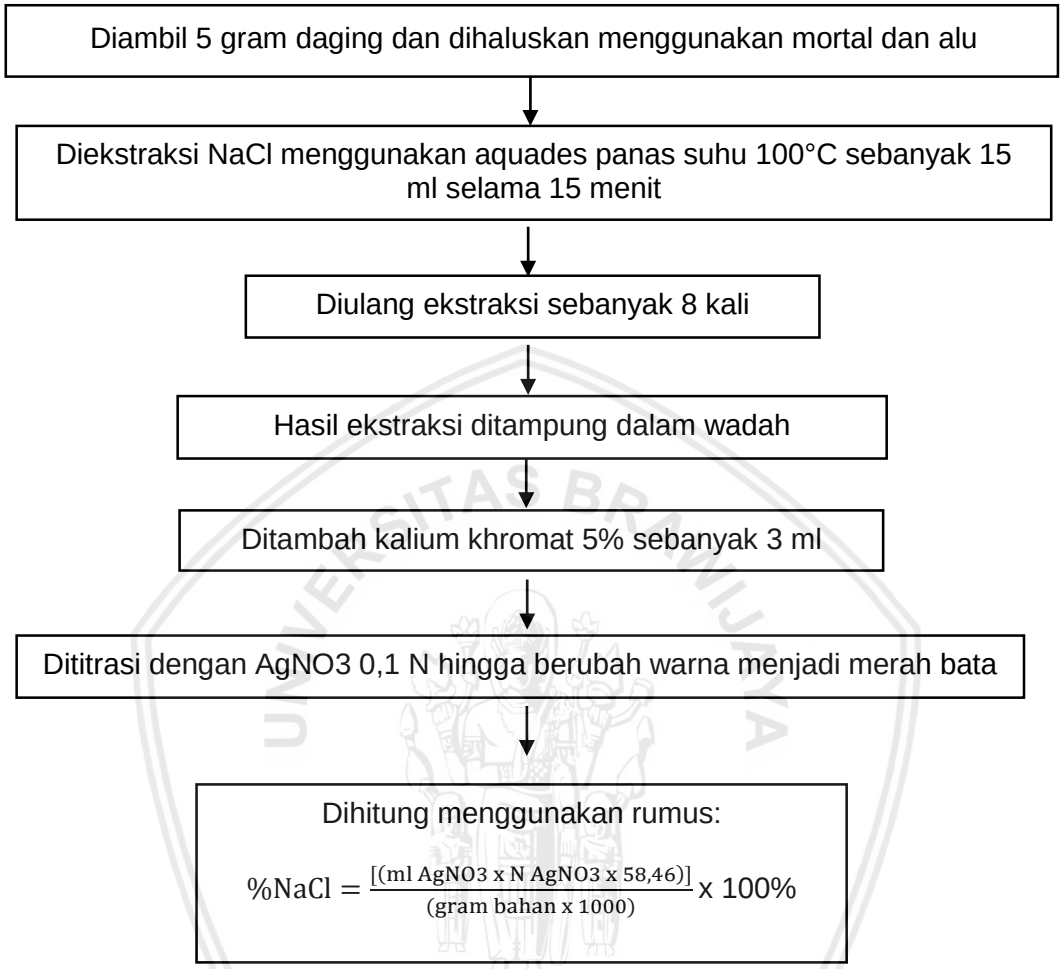
$$\mathrm{N} = \frac{190 + 183 + 85 + 76}{\{(1 \times 2) + (0{,}1 \times 2)\} \times 10^{-9}}$$

$$\mathrm{N} = \frac{534}{\{(2) + (0{,}2)\} \times 10^{-9}}$$

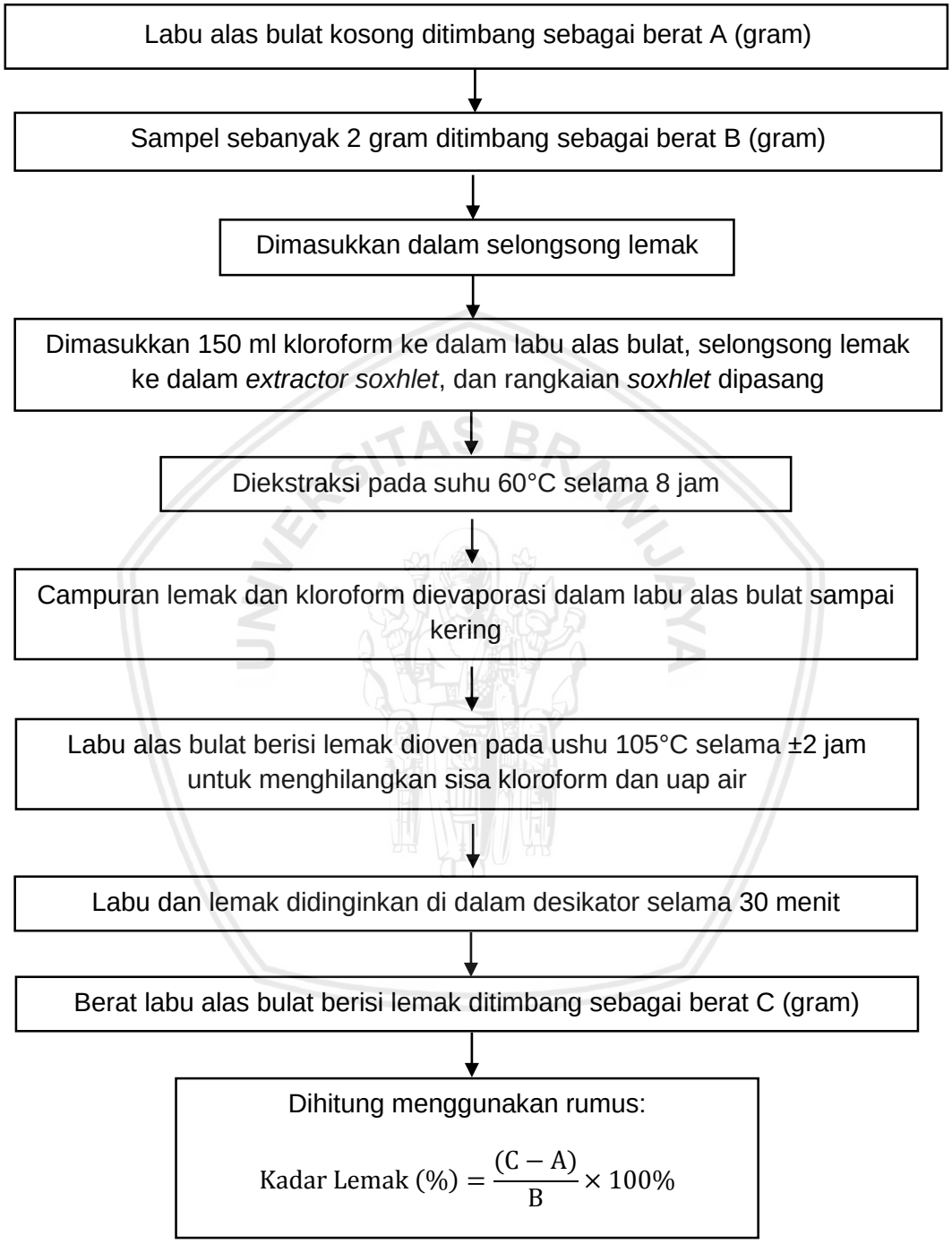
$$\mathrm{N} = \frac{534}{2{,}2 \times 10^{-9}}$$

$\mathrm{N} = 2{,}42 \times 10^{11}$ koloni/g.

Lampiran 15. Uji kadar garam (metode titrasi argentometri)

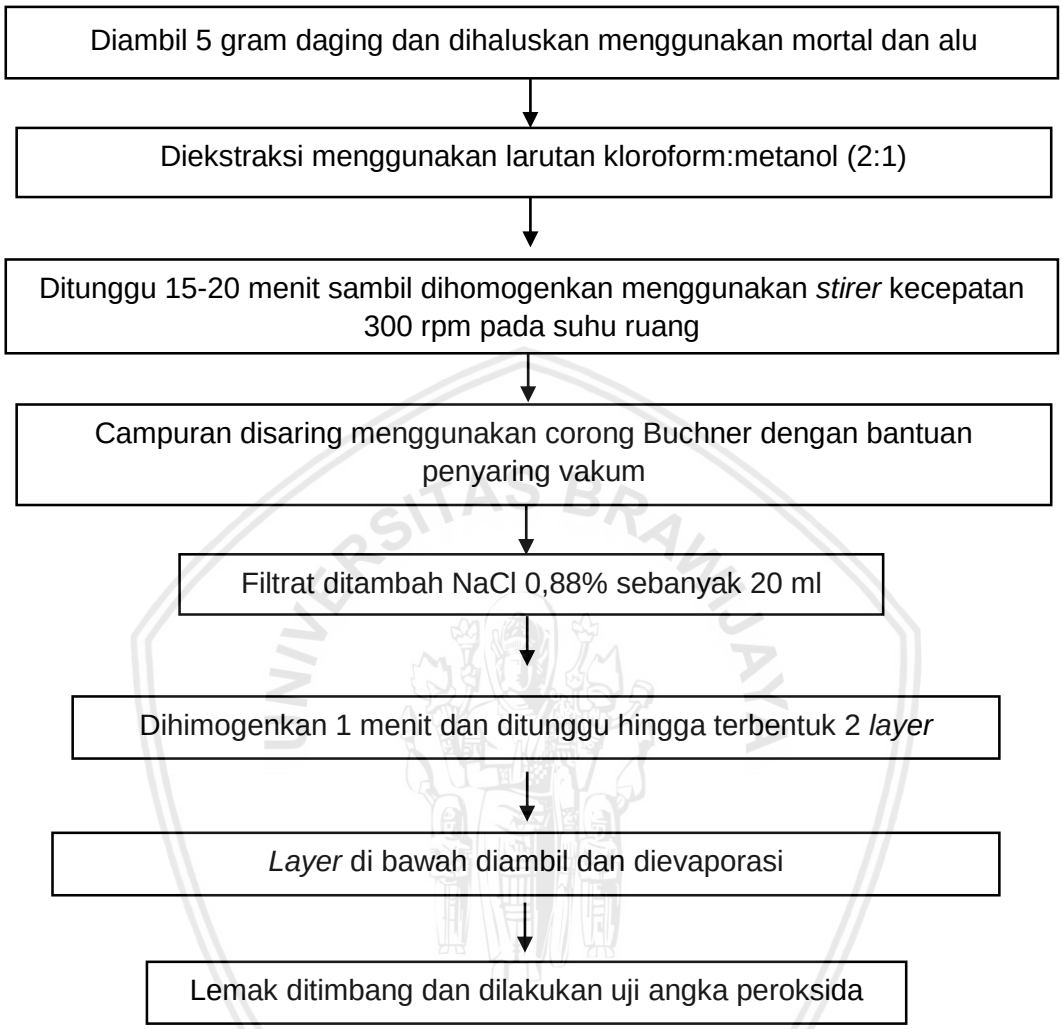


Lampiran 16. Uji kadar lemak (SNI 01-2354.3-2006)

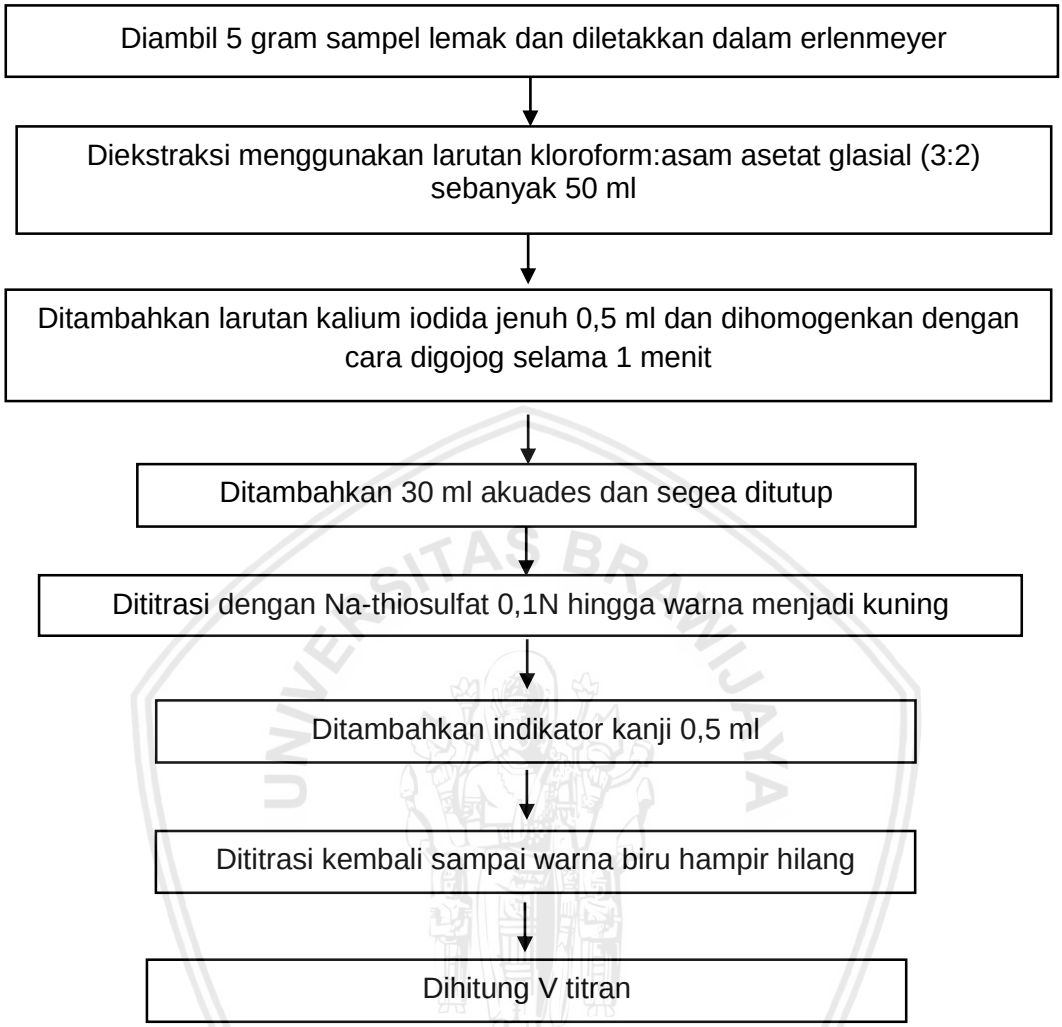


Lampiran 17. Uji angka peroksida

a. Ekstraksi sampel



b. Uji angka peroksida

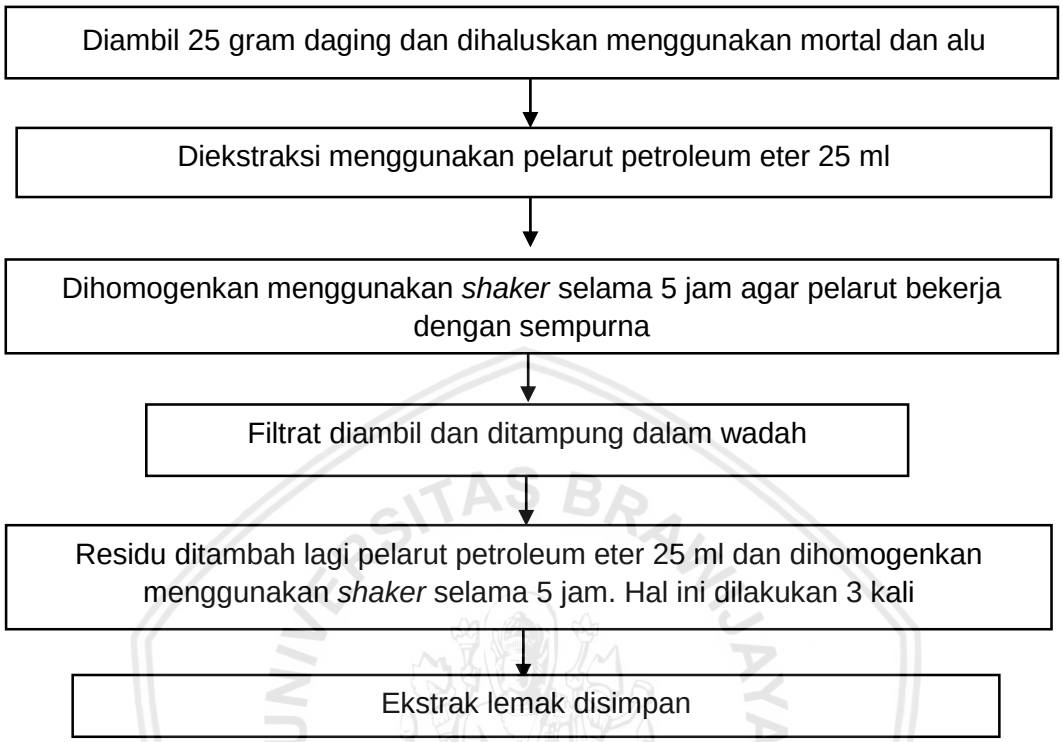


Dihitung menggunakan rumus:

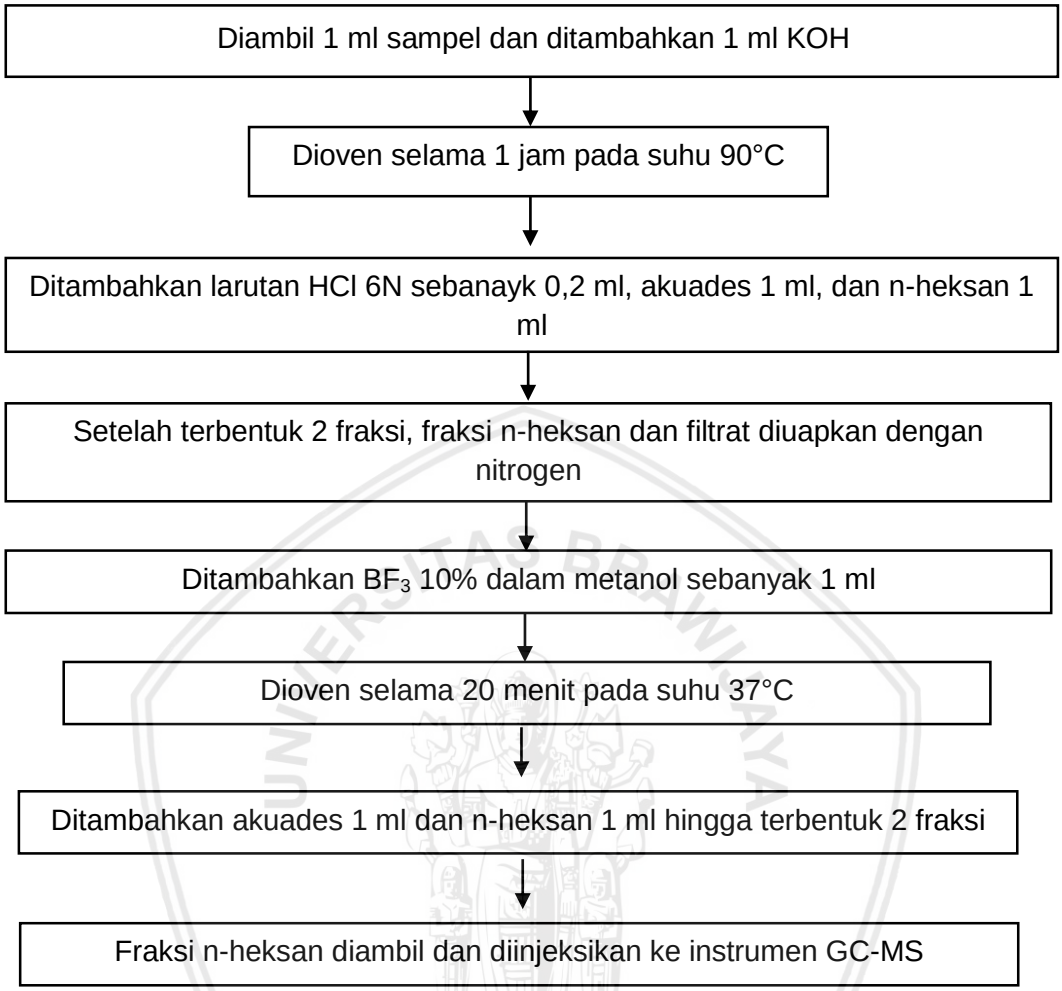
$$\text{Bilangan peroksida (mek O2/kg)} = \frac{1000 \times \text{N} \times (\text{V0} - \text{V1})}{\text{W}}$$

Lampiran 18. Uji profil asam lemak

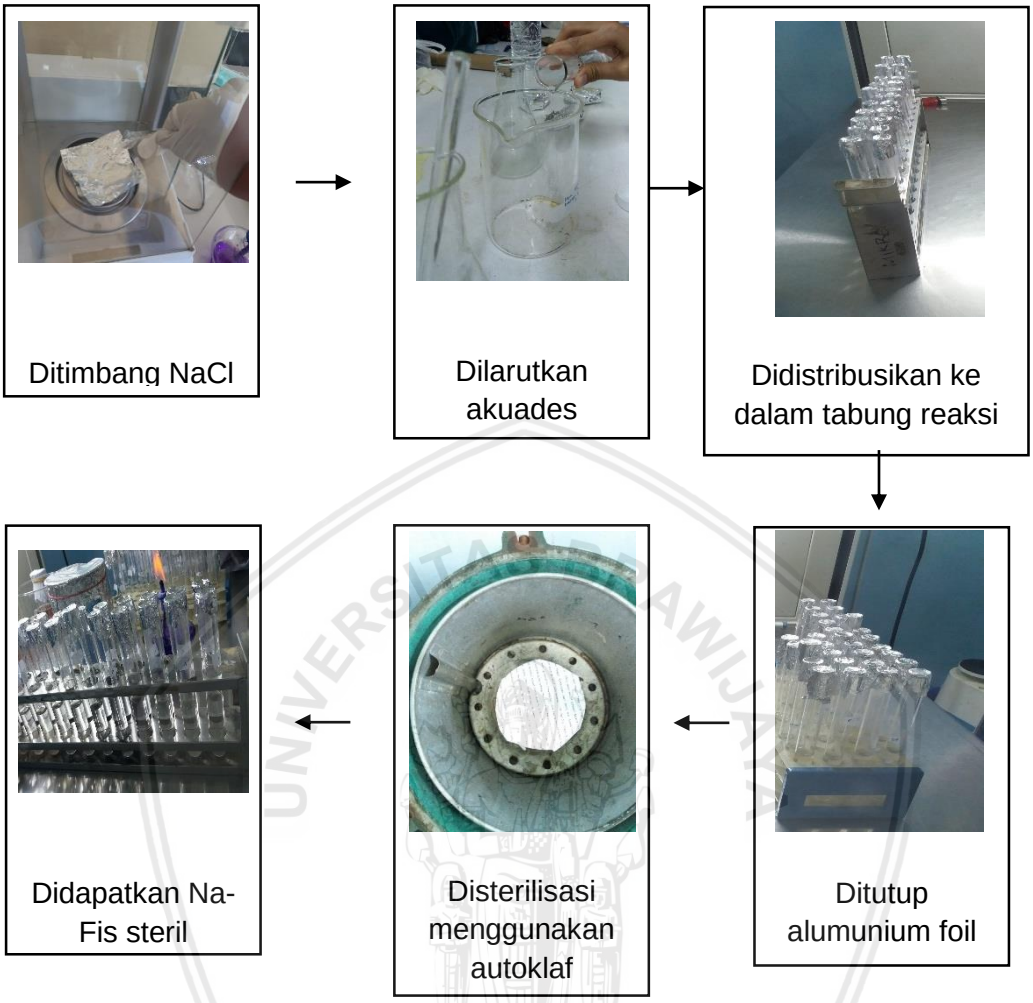
a. Ekstraksi sampel



b. Esterifikasi



Lampiran 19. Dokumentasi pembuatan larutan Na-Fis



Lampiran 20. Dokumentasi pembuatan media TSA

Ditimbang TSA 0,8 gram

Dilarutkan akuades 20 ml

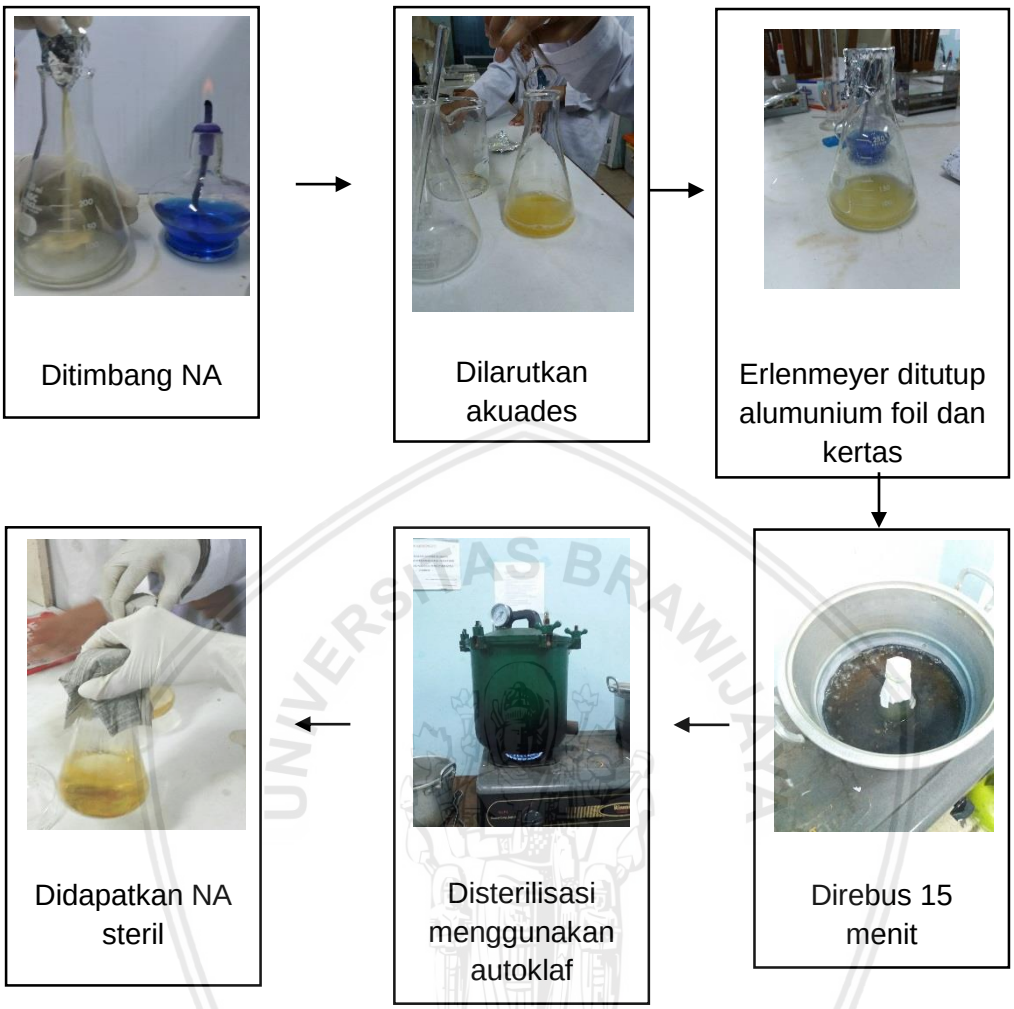
Erlenmeyer ditutup alumunium foil dan kertas

Direbus 15 menit

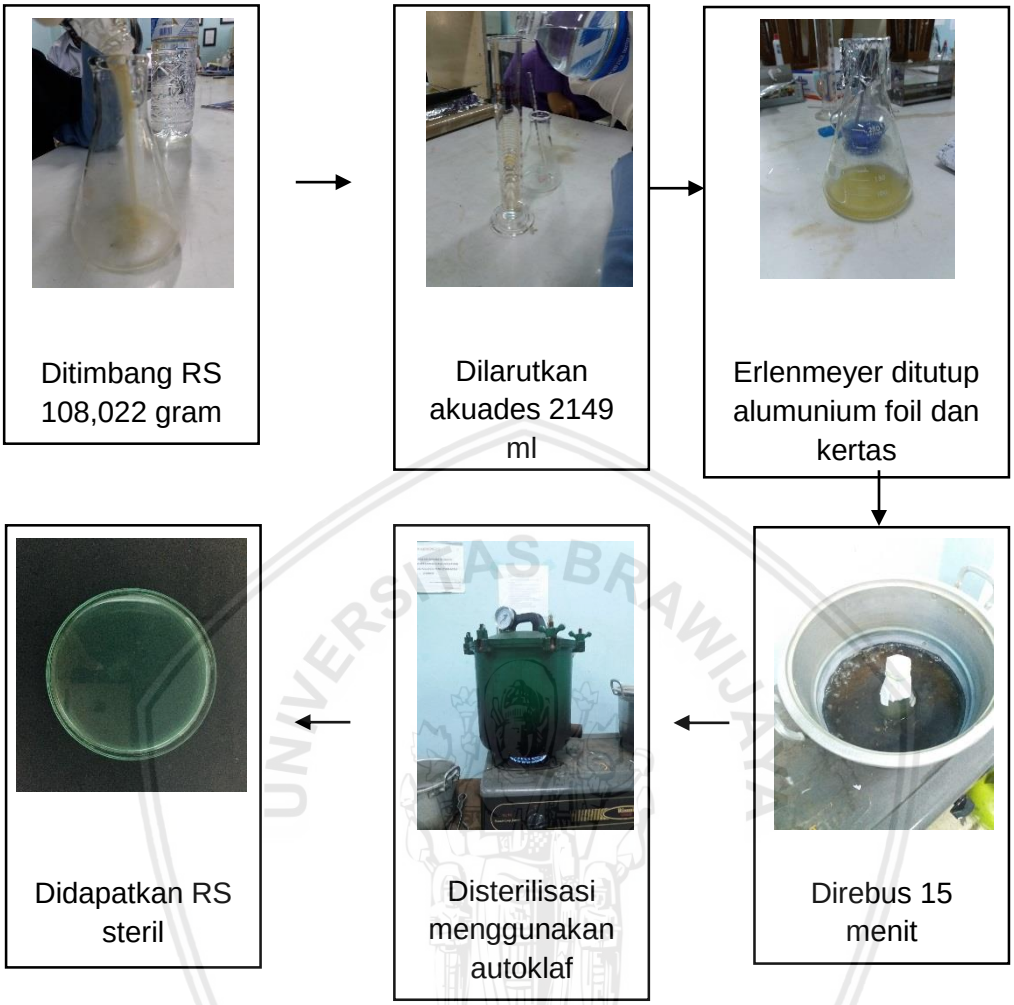
Disterilisasi menggunakan autoklaf

Didistribusikan ke tabung reaksi dan dimiringkan

Lampiran 21. Dokumentasi pembuatan media NA



Lampiran 22. Dokumentasi pembuatan media RS



Lampiran 23. Dokumentasi pembuatan media TSB

Lampiran 24. Dokumentasi peremajaan *Aeromonas hydrophila*

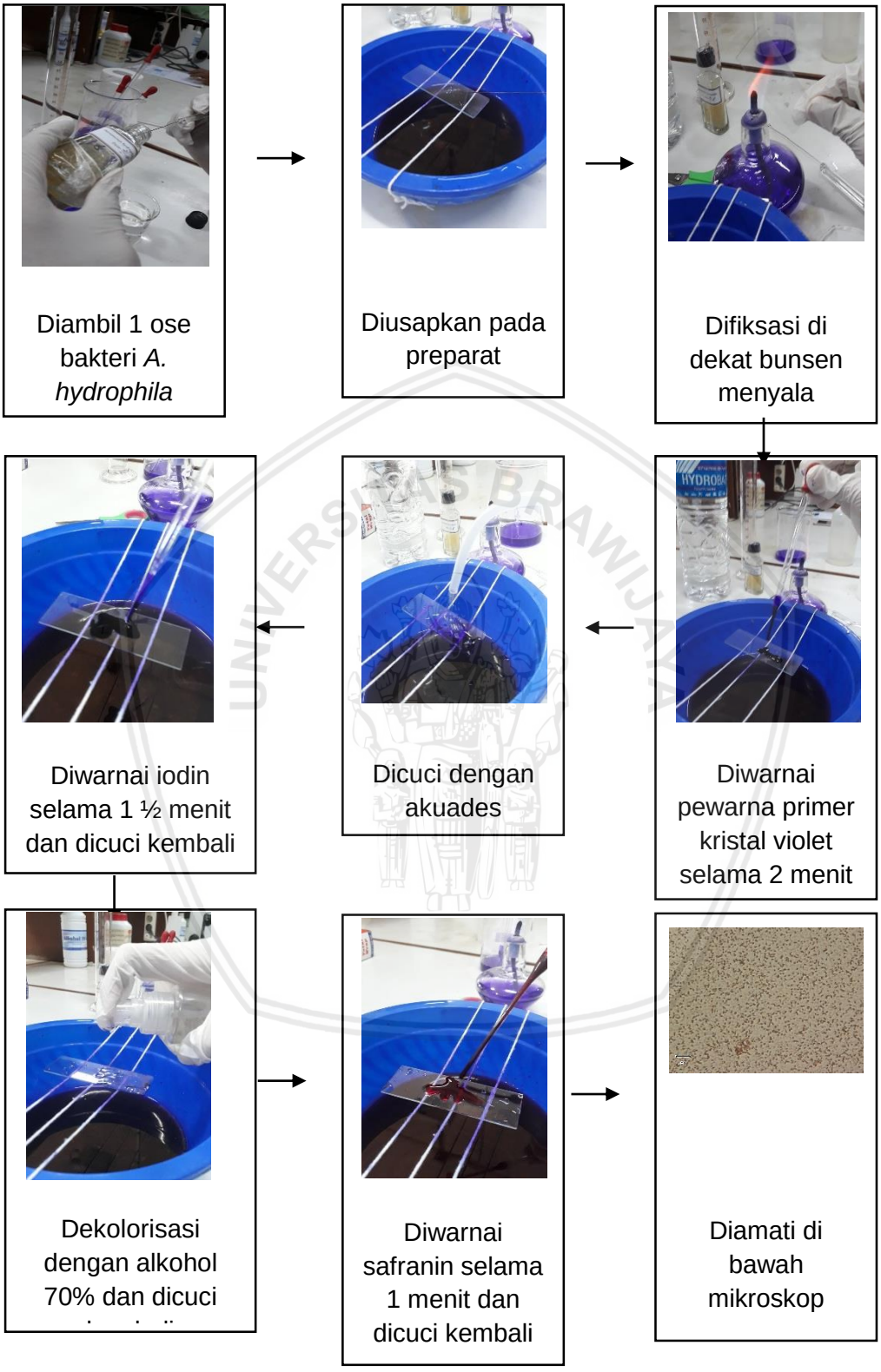
Diambil 1 ose dari kultur murni

Digoreskan pada media TSA miring

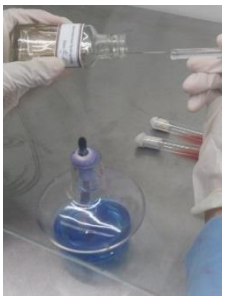
Diinkubasi 24 jam pada suhu 30°C

Didapatkan kultur baru

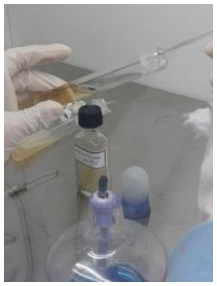
Lampiran 25. Dokumentasi pewarnaan gram *Aeromonas hydrophila*



Lampiran 26. Dokumentasi uji gelatin



Diambil 1 ose dari kultur murni



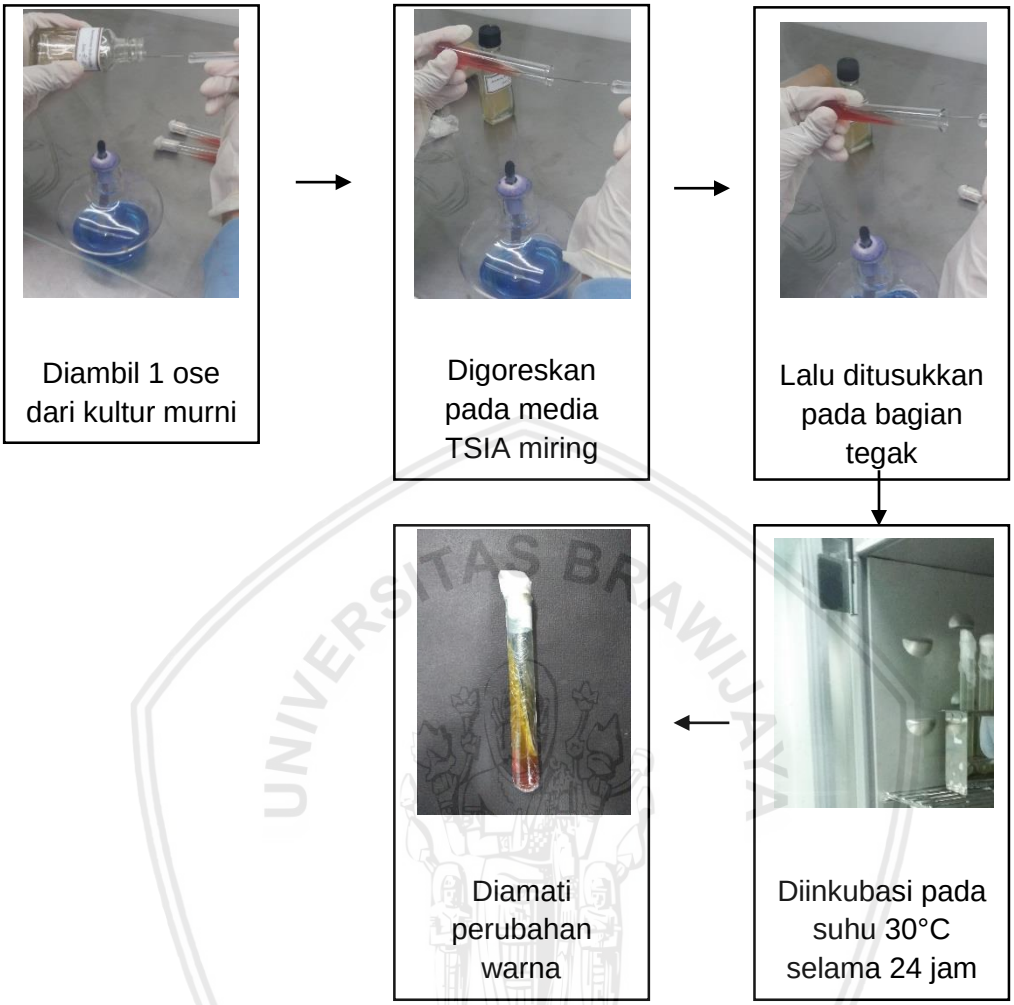
Dicelupkan dalam media gelatin

Diinkubasi 24 jam pada suhu 30°C

Didinginkan dalam kulkas selama 15 menit

Diamati perubahan yang terjadi

Lampiran 27. Dokumentasi uji TSIA

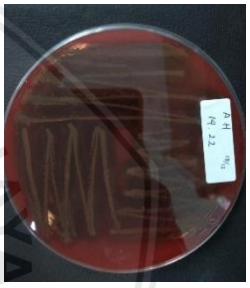


Lampiran 28. Dokumentasi uji hemolisin

Diambil 1 ose dari kultur murni

Digoreskan pada media agar darah

Diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam



Diamati perubahan warna

Lampiran 29. Dokumentasi uji kepadatan bakteri *Aeromonas hydrophila*

Diambil 1 ose bakteri *A. hydrophila*

Dilakukan pengenceran pada Na-Fis

Diambil 1 ml tiap pengenceran dari 4 pengenceran terakhir

Diletakkan dalam cawan petri dan dituang media NA

Diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam

Lampiran 30. Dokumentasi infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan perlakuan garam

Akuarium diklorinasi

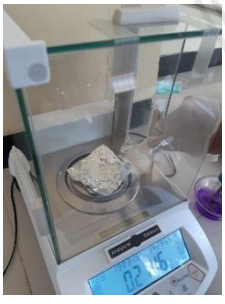
Lele diaklimatisasi

Dimasukkan media TSB yang berisi kultur *A. hydrophila*

Diberi pakan dan aerasi 24 jam

Ikan dipanen

Daging dilumatkan



Diberi perlakuan garam 0%, 5%, 10%, dan 15%

Didistribusikan dalam plastik klip tiap uji

Lampiran 31. Dokumentasi uji TPC pasca-panen

Diambil 1 gram sampel

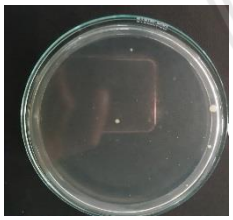
Dimasukkan dalam Na-Fis 9 ml

Diambil 1 ml ke pengenceran berikutnya

Diambil 1 ml dari 4 pengenceran terakhir dan diletakkan dalam cawan petri

Dituang media NA atau RS

Diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam



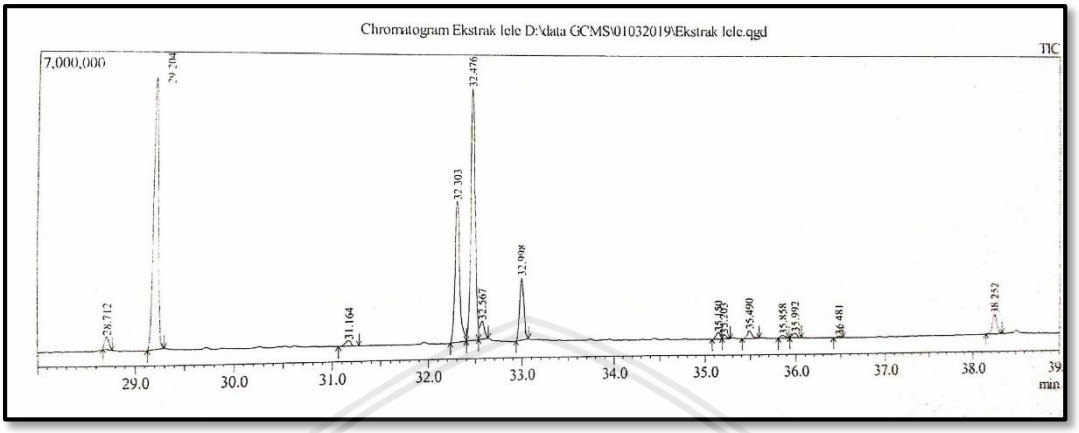
Dihitung jumlah koloni yang terbentuk

Lampiran 32. Hasil uji kadar lemak *wet basis*

Perlakuan	Ulangan			Rata-rata	Stdev
	1	2	3		
K 0%	2,920	2,840	2,930	2,897	0,05
K 5%	1,240	1,224	1,232	1,232	0,01
K 10%	1,630	1,613	1,622	1,622	0,01
K 15%	2,630	2,810	2,720	2,720	0,09
AH 0%	3,020	3,037	3,106	3,054	0,05
AH 5%	1,020	1,350	1,185	1,185	0,17
AH 10%	2,680	2,970	2,825	2,825	0,15
AH 15%	3,440	3,140	3,725	3,435	0,29

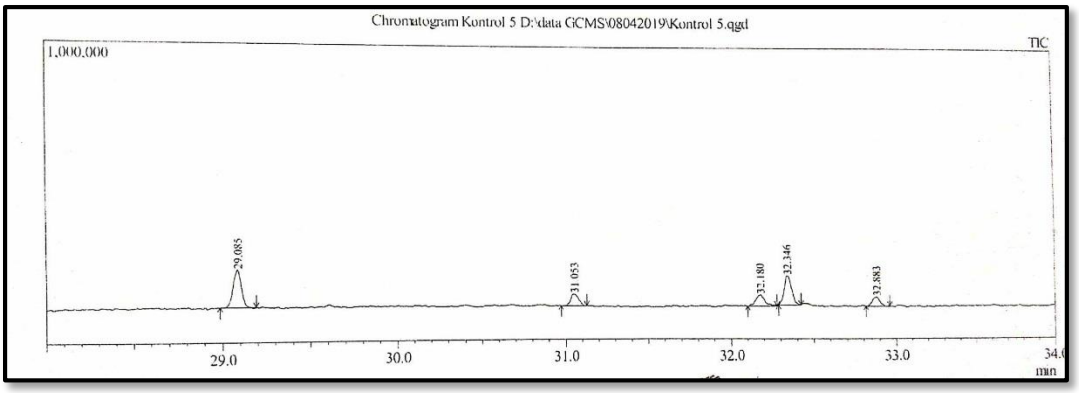
Lampiran 33. Hasil kromatogram pada uji profil asam lemak

- Sampel K 0%



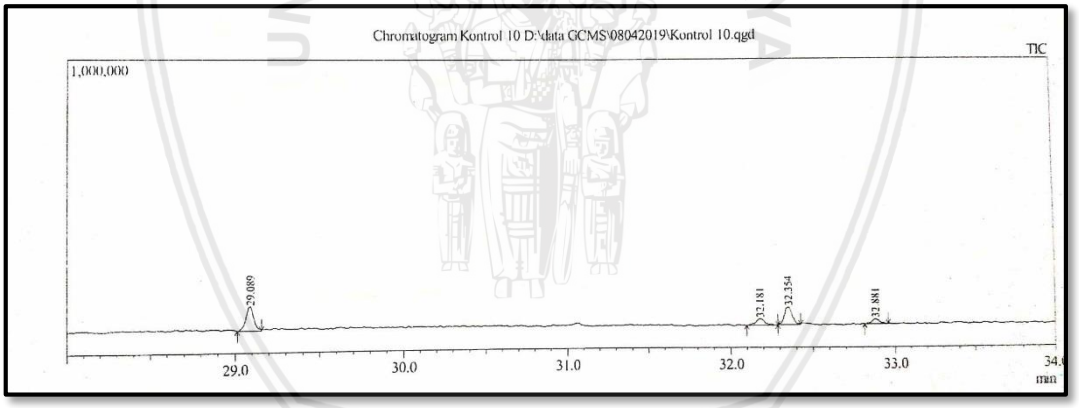
No.	Nama Senyawa	R. Time	m/z	BM	SI	Area	%
1.	10-Undekanoat	28,713	55	198	88	56802	0,727
2.	Oktadekanoat	29,204	74	298	91	3589286	45,943
3.	Tetradekanoat	31,166	43	270	87	35007	0,448
4.	9,12-Oktadekadienoat	32,302	67	294	89	1109615	14,203
5.	11-Oktadekanoat	32,476	55	296	90	1829687	23,420
6.	15-Tetrakosanoat	32,580	55	380	86	131916	1,689
7.	Tetrakosanoat	32,997	74	382	91	769775	9,853
8.	9,12,15-Oktadekatrienoat	35,148	41	262	85	43121	0,552
9.	1,3,5-Hexatriene	35,230	41	94	74	23283	0,298
10.	5,8-Oktadekadienoat	35,490	41	294	86	41534	0,532
11.	5-Tetradecyne	35,856	67	194	87	16959	0,217
12.	13-Dokosenoat	35,993	55	352	87	34843	0,446
13.	Heptakosanoat	36,480	74	424	88	13303	0,170
14.	6,9,12-Oktadekatrienoat	38,252	41	292	83	117425	1,503

- Sampel K 5%



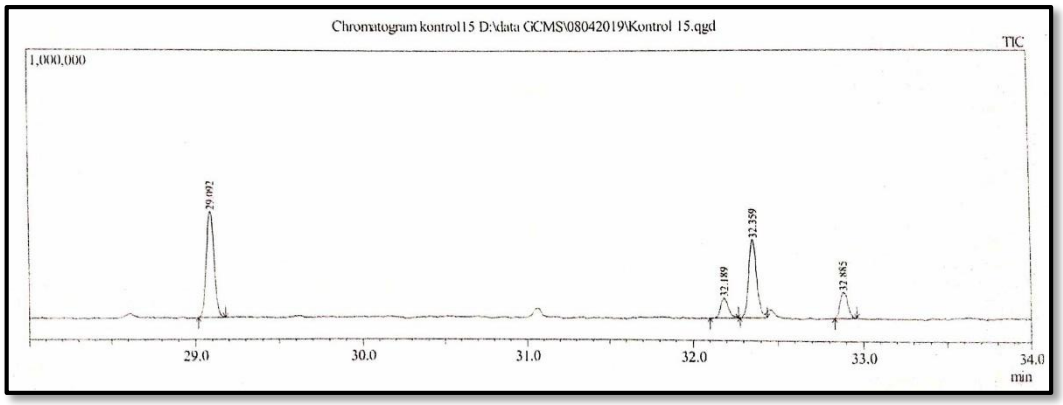
No.	Nama Senyawa	R. Time	m/z	BM	SI	Area	%
1.	Oktadekanoat	29,085	74	298	88	72212	44,795
2.	Tetradekanoat	31,056	43	270	87	18692	11,595
3.	9,12-Oktadekadienoat	32,177	67	294	89	14840	9,206
4.	11-Oktadekanoat	32,343	55	296	88	38660	23,982
5.	Tetrakosanoat	32,882	74	382	87	16800	10,422

- Sampel K 10%



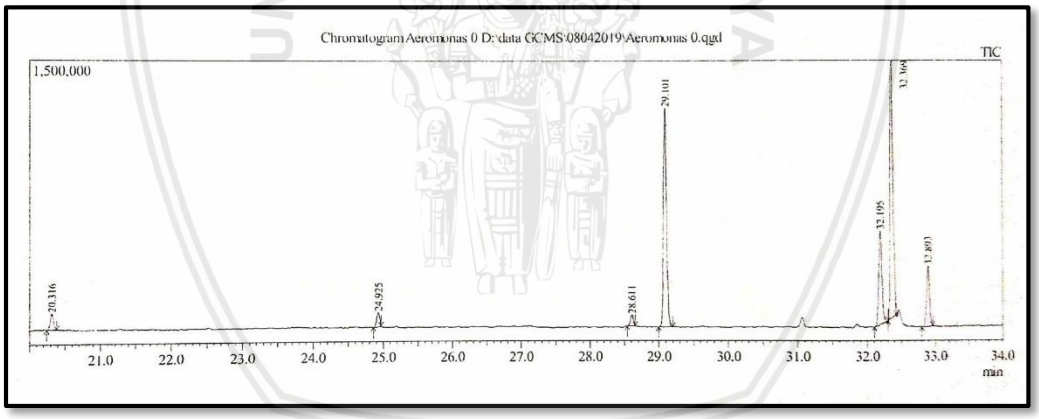
No.	Nama Senyawa	R. Time	m/z	BM	SI	Area	%
1.	Oktadekanoat	29,084	74	298	88	45294	54,200
2.	9,12-Oktadekadienoat	32,186	67	294	87	8401	10,053
3.	11-Oktadekanoat	32,354	55	296	89	20857	24,958
4.	Tetrakosanoat	32,884	74	382	85	9017	10,790

- Sampel K 15%



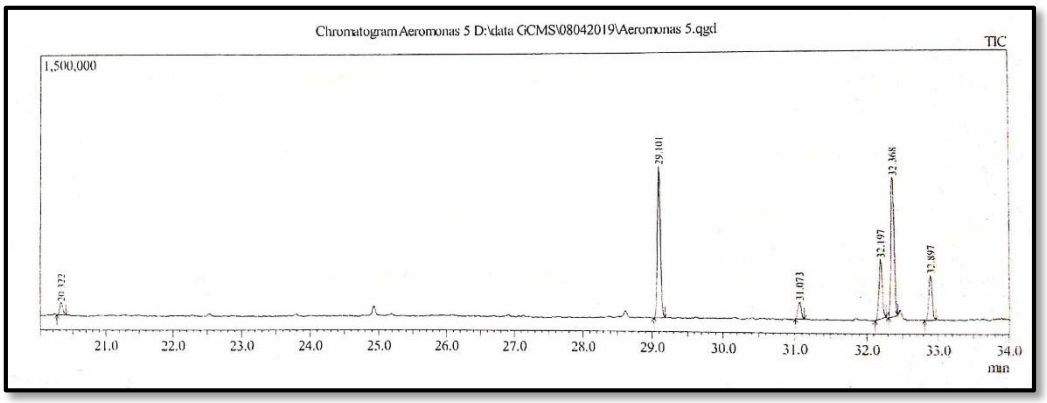
No.	Nama Senyawa	R. Time	m/z	BM	SI	Area	%
1.	Oktadekanoat	29,089	74	298	90	220606	56,302
2.	9,12-Oktadekadienoat	32,186	67	294	88	25473	6,501
3.	11-Oktadekanoat	32,360	55	296	89	102597	26,184
4.	Tetrakosanoat	32,887	74	382	88	43151	11,013

- Sampel AH 0%



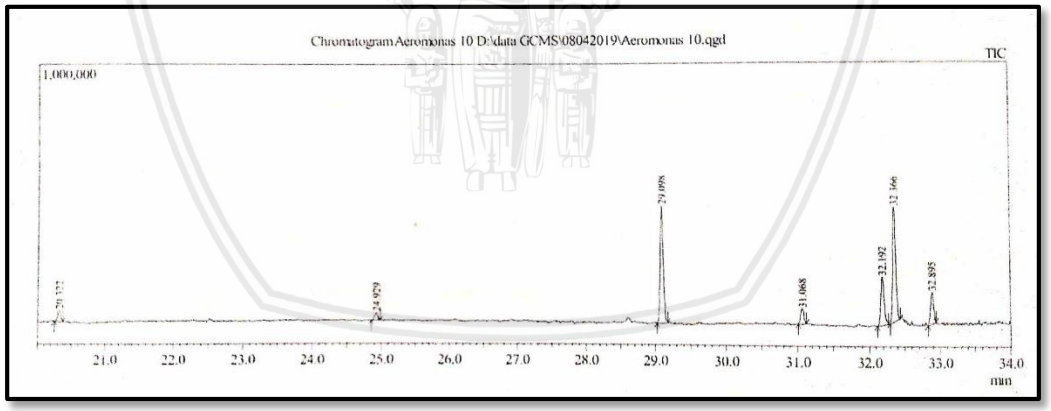
No.	Nama Senyawa	R. Time	m/z	BM	SI	Area	%
1.	Dekanoat	20,317	74	186	89	62982	3,734
2.	Nonanoat	24,925	74	172	88	55236	3,275
3.	10-Undekanoat	28,611	55	198	87	20788	1,233
4.	Oktadekanoat	29,101	74	298	90	703473	41,710
5.	9,12-Oktadekadienoat	32,199	67	294	88	186343	11,049
6.	11-Oktadekanoat	32,370	55	296	90	495451	29,376
7.	Tetrakosanoat	32,895	74	382	90	162290	9,623

- Sampel AH 5%



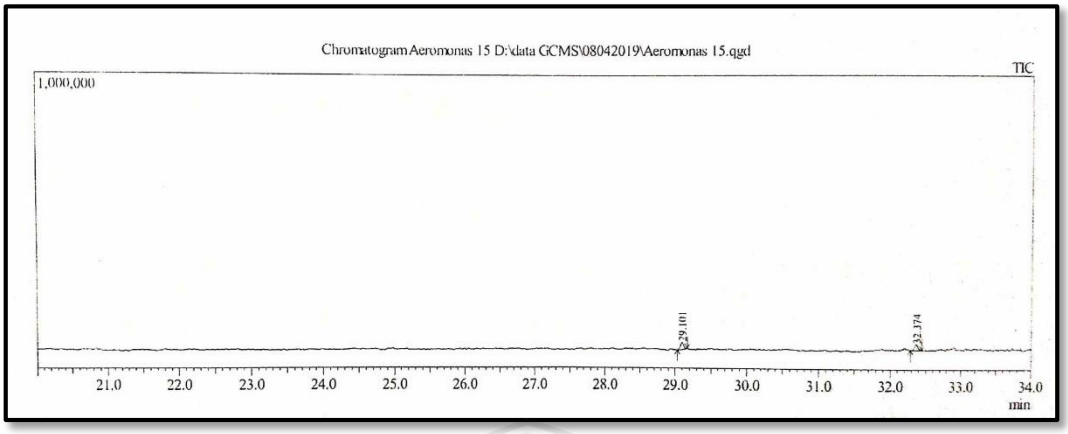
No.	Nama Senyawa	R. Time	m/z	BM	SI	Area	%
1.	Dekanoat	20,322	74	186	88	46426	4,471
2.	Oktadekanoat	29,099	74	298	90	436086	41,998
3.	Tetradekanoat	31,070	43	270	86	36582	3,523
4.	9,12-Oktadekadienoat	32,196	67	294	89	111434	10,732
5.	11-Oktadekanoat	32,369	55	296	90	279391	26,907
6.	Tetrakosanoat	32,903	74	382	90	128427	12,368

- Sampel AH 10%



No.	Nama Senyawa	R. Time	m/z	BM	SI	Area	%
1.	Dekanoat	20,324	74	186	88	28056	5,007
2.	10-Undekanoat	24,929	74	270	88	17624	3,145
3.	Oktadekanoat	29,097	74	298	89	218834	39,051
4.	Tetradekanoat	31,068	43	270	87	28363	5,061
5.	9,12-Oktadekadienoat	32,199	67	294	88	61611	10,995
6.	11-Oktadekanoat	32,366	55	296	89	151155	26,974
7.	Tetrakosanoat	32,891	74	382	89	54735	9,768

- Sampel AH 15%



No.	Nama Senyawa	R. Time	m/z	BM	SI	Area	%
1.	Oktadekanoat	29,103	74	298	87	4475	70,196
2.	Tetrakosanoat	32,368	55	296	85	2193	29,802

Lampiran 34. Hasil analisis uji TPC non-selektif dengan aplikasi SPSS

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A	3	9.9300	.01000	.00577	9.9052	9.9548	9.92	9.94
B	3	8.7400	.02000	.01155	8.6903	8.7897	8.72	8.76
C	3	6.7000	.04359	.02517	6.5917	6.8083	6.65	6.73
D	3	4.6133	.09074	.05239	4.3879	4.8387	4.51	4.68
E	3	26.4300	.01000	.00577	26.4052	26.4548	26.42	26.44
F	3	15.4900	.00000	.00000	15.4900	15.4900	15.49	15.49
G	3	11.1233	.02309	.01333	11.0660	11.1807	11.11	11.15
H	3	8.8933	.01528	.00882	8.8554	8.9313	8.88	8.91
Total	24	11.4900	6.52404	1.33171	8.7351	14.2449	4.51	26.44

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	978.928	7	139.847	9.728E4	.000
Within Groups	.023	16	.001		
Total	978.951	23			

TPC

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
D	3	4.6133							
C	3		6.7000						
B	3			8.7400					
H	3				8.8933				
A	3					9.9300			
G	3						11.1233		
F	3							15.4900	
E	3								26.4300
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 35. Hasil analisis uji TPC selektif dengan aplikasi SPSS

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A	3	9.1667	.01155	.00667	9.1380	9.1954	9.16	9.18
B	3	8.0067	.06658	.03844	7.8413	8.1721	7.93	8.05
C	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
D	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
E	3	25.1933	.13279	.07667	24.8635	25.5232	25.04	25.27
F	3	15.1500	.00000	.00000	15.1500	15.1500	15.15	15.15
G	3	11.1133	.03512	.02028	11.0261	11.2006	11.08	11.15
H	3	8.8567	.02517	.01453	7.7942	8.9192	8.83	8.88
Total	24	9.6858	7.77790	1.58766	6.4015	12.9702	.00	25.27

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1391.354	7	198.765	6.607E4	.000
Within Groups	.048	16	.003		
Total	1391.403	23			

TPC

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
C	3	.0000						
D	3	.0000						
B	3		8.0067					
H	3			8.8567				
A	3				9.1667			
G	3					11.1133		
F	3						15.1500	
E	3							25.1933
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 36. Hasil analisis uji kadar garam dengan aplikasi SPSS

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A	3	.3267	.38397	.22169	-.6272	1.2805	.10	.77
B	3	5.4533	.73664	.42530	3.6234	7.2832	4.63	6.05
C	3	10.2133	1.21476	.70134	7.1957	13.2310	8.82	11.05
D	3	13.2333	.90467	.52231	10.9860	15.4807	12.19	13.80
E	3	.4100	.33000	.19053	-.4098	1.2298	.08	.74
F	3	5.7000	.71000	.40992	3.9363	7.4637	4.99	6.41
G	3	11.4667	1.11500	.64375	8.6968	14.2365	10.35	12.58
H	3	13.0467	.80501	.46477	11.0469	15.0464	12.24	13.85
Total	24	7.4812	5.10170	1.04138	5.3270	9.6355	.08	13.85

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	587.652	7	83.950	122.368	.000
Within Groups	10.977	16	.686		
Total	598.629	23			

Kadar Garam

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
A	3	.3267			
E	3	.4100			
B	3		5.4533		
F	3		5.7000		
C	3			10.2133	
G	3			11.4667	
H	3				13.0467
D	3				13.2333
Sig.		.903	.720	.082	.786

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 37. Hasil analisis uji angka peroksida dengan aplikasi SPSS

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A	3	18.8267	.83500	.48209	16.7524	20.9009	17.99	19.66
B	3	13.5967	2.12500	1.22687	8.3179	18.8755	11.47	15.72
C	3	11.6667	2.09500	1.20955	6.4624	16.8709	9.57	13.76
D	3	9.3367	2.06500	1.19223	4.2069	14.4664	7.27	11.40
E	3	19.1200	1.54000	.88912	15.2944	22.9456	17.58	20.66
F	3	18.0200	1.95000	1.12583	13.1759	22.8641	16.07	19.97
G	3	15.1567	1.37500	.79386	11.7410	18.5724	13.78	16.53
H	3	13.9600	1.71000	.98727	9.7121	18.2079	12.25	15.67
Total	24	14.9604	3.67522	.75020	13.4085	16.5123	7.27	20.66

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	260.957	7	37.280	11.999	.000
Within Groups	49.710	16	3.107		
Total	310.667	23			

Angka Peroksida

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
D	3	9.3367				
C	3	11.6667	11.6667			
B	3		13.5967	13.5967		
H	3		13.9600	13.9600		
G	3			15.1567	15.1567	
F	3				18.0200	18.0200
A	3					18.8267
E	3					19.1200
Sig.		.125	.150	.320	.064	.480

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 38. Hasil analisis uji kadar lemak dengan aplikasi SPSS

Descriptives

Kadar Lemak

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A	3	14.5033	.20817	.12019	13.9862	15.0204	14.27	14.67
B	3	5.2733	.14503	.08373	4.9131	5.6336	5.13	5.42
C	3	6.1600	.12000	.06928	5.8619	6.4581	6.04	6.28
D	3	8.8867	.10504	.06064	8.6257	9.1476	8.78	8.99
E	3	13.1333	.37528	.21667	12.2011	14.0656	12.70	13.35
F	3	4.4067	.57882	.33418	2.9688	5.8445	3.87	5.02
G	3	9.3833	.46058	.26592	8.2392	10.5275	8.99	9.89
H	3	10.5167	.90002	.51963	8.2809	12.7524	9.62	11.42
Total	24	9.0329	3.50031	.71450	7.5549	10.5110	3.87	14.67

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	278.625	7	39.804	200.543	.000
Within Groups	3.176	16	.198		
Total	281.800	23			

Kadar Lemak

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
F	3	4.4067						
B	3		5.2733					
C	3			6.1600				
D	3				8.8867			
G	3				9.3833			
H	3					10.5167		
E	3						13.1333	
A	3							14.5033
Sig.		1.000	1.000	1.000	.191	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.