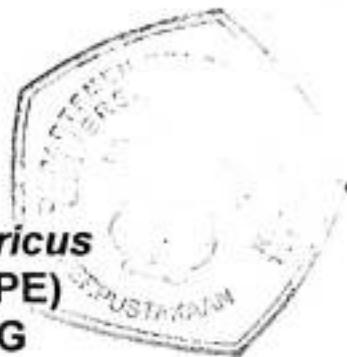


EFEK LAMA INKUBASI DARI *Lactobacillus bulgaricus*
DALAM MEDIA MRSB (DE MAN RAGOSA AND SHARPE)
BROTH TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI YANG
DIHASILKAN



PUTU VIDHA PRABHAWANTHY
N11103318-1



PERPUSTAKAAN	UNIVERSITAS HASANUDDIN
Tgl. Terima	15-12-08
Asal Dari	Farmasi (MIPA)
Banyaknya	1 dus
Marga	Wahid
No. Inventaris	348
No. File	SKR-F08

PRA
e

PROGRAM REGULER SORE
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2008

**EFEK LAMA INKUBASI DARI *Lactobacillus bulgaricus* DALAM MEDIA
MRSB (DE MAN RAGOSA AND SHARPE BROTH) TERHADAP
AKTIVITAS ANTIBAKTERI YANG DIHASILKAN**

SKRIPSI

**Untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**PUTU VIDHA PRABHAWANTHY
N11103318**

**PROGRAM REGULER SORE
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2008**

**EFEK LAMA INKUBASI DARI *Lactobacillus bulgaricus* DALAM MEDIA
MRSB (DE Man Ragosa and Sharpe Broth) TERHADAP AKTIVITAS
ANTIBAKTERI YANG DIHASILKAN**

PUTU VIDHA PRABHAWANTHY

N11103318

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,



Dra. Sartini, M.Si., Apt.
Nip. 131 696 792

Pembimbing Pertama,



Drs. H. Moh. Hasbi, Apt.
Nip. 130 369 543

Pembimbing Kedua,



Dra. Ermina Pakki, M.Si., Apt.
Nip. 131 792 011

Pada tanggal Desember 2008

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur hanya kita panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas karunia dan pertolongan-Nyalah sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Pada kesempatan ini dengan segenap rasa cinta yang tulus penulis menghaturkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada Papa tercinta Made Ratha dan Mama tercinta Ni Ketut Erlawaty, serta kedua Adikku yang tersayang Kadek Vieka Pradnyahaty dan Komang Vitha Pranamasary yang menjadi sumber inspirasi bagi penulis, yang tanpa lelah selalu memberi semangat, perhatian, kasih sayang, dan dukungan serta cinta yang begitu tulus tak mengenal batas sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Terkhusus kepada Ketut Winawa yang juga menjadi inspirasi kedua bagi penulis. Tak ada kata yang pantas atas semua perhatian dan kasih sayangnya selain balasan sayang dan terima kasih penulis haturkan.

Pada kesempatan ini pula, perkenankanlah penulis menyampaikan rasa terima kasih yang tulus dan sebesar - besarnya kepada Bapak Dr. Gemini Alam, M.Si, Apt selaku pembimbing akademik, Ibu Dra. Sartini, M.Si, Apt selaku pembimbing utama, Bapak Drs.H.Moh. Hasbi, Apt selaku pembimbing pertama dan Ibu Dra. Ermina Pakki, M.Si, Apt selaku pembimbing kedua yang ikhlas meluangkan waktu dan memberikan ilmu yang tak terbatas nilainya untuk penulis.

Demikian pula penulis menyampaikan terima kasih kepada Dekan Fakultas Farmasi serta segenap staf atas segala fasilitas yang diberikan selama penulis menempuh studi hingga menyelesaikan penelitian ini.

Terima kasih untuk Kepala Laboratorium Mikrobiologi Farmasi, Dr. M. Natsir Djide, MS., Apt. atas izin penggunaan fasilitas laboratorium dan segenap staf laboratorium Kakak Haslia dan Kakak Dewi yang senantiasa membantu penulis dalam pelaksanaan penelitian ini.

Terima kasih yang tulus kepada Bapak dan Ibu Dosen Fakultas Farmasi Reguler Sore yang senantiasa memberikan pengetahuan yang begitu ternilai dan berharga bagi penulis.

Terkhusus lagi kepada Kakak Agus Hendra Permana dan sahabat karibku Ni Komang Armoni, I Nyoman Sumadi, Siti Maidah dan Ngurah Putu Aryakasta yang selalu memberi semangat dan senantiasa menemaniku dikala sedih ataupun senang, serta teman-temanku Aisyah, Ami, Ani, Aas, Dina, Fifin, Ndari, Hera, Uni, Umrah, dan teman-teman seperjuanganku Acha, Ana, Nely, Nitha, Yaya dan Ikha. Tak lupa juga penulis mengucapkan rasa terimakasih kepada Phu, Lamy, Latri, Yuyun dan semua keluarga yang ada di Luwuk (Toili) dan di Bali yang namanya tidak bisa penulis sebutkan satu persatu. Hidup ini begitu indah dan berarti karena kalian ada disampingku.

Akhir kata semoga karya kecil ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dibidang farmasi.

Makassar, 20 Agustus 2008

Penulis

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian efek lama inkubasi dari *Lactobacillus bulgaricus* dalam media MRS (DE Man Ragosa and Sharpe) Broth terhadap aktivitas antibakteri yang dihasilkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lama inkubasi dari *Lactobacillus bulgaricus* dalam media MRSB yang menghasilkan metabolit yang mampu menghambat pertumbuhan *Salmonella thyposa* dan *Escherichia coli*. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar dengan menggunakan *paper disc*, media MHA (Mueller Hinton Agar) yang diinkubasi selama 1-2 x 24 jam pada suhu 37°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri terbesar terhadap bakteri uji adalah metabolit yang dihasilkan dengan lama inkubasi 48 jam dengan diameter zona hambatan rata-rata untuk *Escherichia coli* 13,3 mm dan *Salmonella thyposa* 15,4 mm.

Kata kunci : Media MRSB, *Lactobacillus bulgaricus*, antibakteri dan lama inkubasi.

ABSTRACT

The research of incubation time from *Lactobacillus bulgaricus* in DE Man Ragosa and Sharpe Broth against antibacterial activity. This research aimed to know how long incubation time of *Lactobacillus bulgaricus* at DE Man Ragosa and Sharpe Broth and produce metabolite capable to pursue growth of *Salmonella thyposa* and *Escherichia coli*. The test of antibacterial activity doing with diffusion agar method and using *paper disc*, media MHA (Mueller Hinton Agar), incubation during 1-2 x 24 hours at temperature 37°C. The research showed that which the biggest activity antibacterial to test bacterium was metabolite yielded 48 hours period incubasi with rate diameter zone resistance for *Escherichia coli* 13.3 mm and *Salmonella thyposa* 15.4 mm.

Key word : MRSB, *Lactobacillus bulgaricus* and antibacterial and incubation time.

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
II.1 Bakteri Asam Laktat	3
II.1.1 Uraian Umum Bakteri Asam Laktat	3
II.1.2 Metabolisme Bakteri Asam Laktat	6
II.2 Fase-Fase Pertumbuhan Mikroorganisme	8
II.2.1 Fase Lag atau Fase Adaptasi	8
II.2.2 Fase Pertumbuhan yang Dipercepat	9
II.2.3 Fase Eksponensial atau Fase Logaritma	9
II.2.4 Fase Pertumbuhan yang Mulai Terhambat	9
II.2.5 Fase Stasioner	10

II.2.6	Fase Kematian yang dipercepat dan Fase Kematian	
	Logaritma	10
II.3	Uraian Umum Antimikroba	11
II.4	Aktivitas dan Spektrum Antimikroba	12
II.5	Mekanisme Kerja ANtimikroba	12
II.5.1	Antimikroba yang Menghambat Metabolisme Sel Mikroba ...	13
II.5.2	Antimikroba yang Menghambat Sintesis Dinding Sel Mikroba	13
II.5.3	Antimikroba yang Mengganggu Keutuhan Membran Sel	
	Mikroba	14
II.5.4	Antimikroba yang Menghambat Sintesis Protein Sel Mikroba	15
II.5.5	Antimikroba yang Menghambat Sintesis atau Merusak	
	Asam Nukleat Sel Mikroba	15
II.6	Pengukuran Aktivitas Antimikroba	16
II.6.1	Cara Pengenceran (Dilution Methods)	16
II.6.2	Cara Difusi	17
II.6.2.1	Cara Difusi Kertas Saring	17
II.6.2.2	Cara Difusi dengan Silinder Pipih	17
II.6.2.3	Cara Difusi dengan cara Kirby Bauer	18
II.6.2.4	Cara Difusi dengan cara agar berlapis	18
II.7	Uraian Bakteri	18
II.7.1	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	18
II.7.2	<i>Escherichia coli</i>	20
II.7.3	<i>Salmonella thyposa</i>	21

BAB III	METODOLOGI PENELITIAN	23
III.1	Alat dan Bahan	23
III.2	Metode Kerja	23
III.2.1	Sterilisasi Alat	23
III.3	Pembuatan Larutan	24
III.3.1	Pembuatan Larutan NaCl 0,9 %	24
III.4	Pembuatan Medium	24
III.4.1	Pembuatan Medium NA	24
III.4.2	Pembuatan Medium MRSB	24
III.4.3	Pembuatan Medium MHA	25
III.5	Penyiapan Sampel	25
III.5.1	Peremajaan <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	25
III.5.2	Pembuatan Suspensi <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	25
III.5.3	Produksi Metabolit <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (Larutan Uji)	26
III.6	Penyiapan Bakteri Uji	26
III.6.1	Peremajaan Bakteri Uji	26
III.6.2	Pembuatan Suspensi Bakteri Uji	26
III.6.3	Prosedur Uji Aktivitas Antibakteri	26
III.7	Pengamatan	27
III.8	Pengumpulan Data	27
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	28
IV.1	HASIL PENELITIAN	28
IV.2	PEMBAHASAN	29

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	32
V.1 KESIMPULAN	32
V.2 PEMBAHASAN	32
DAFTAR PUSTAKA	33

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Diameter daya hambat <i>Lactobacillus bulgaricus</i> dalam media MRSB terhadap aktivitas antibakteri yang dihasilkan	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kurva Pertumbuhan Mikroorganisme	10
2. Bakteri <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	19
3. Hasil pengamatan zona hambatan dari <i>Lactobacillus bulgaricus</i> dalam media MRSB dengan menggunakan bakteri uji <i>Escherichia coli</i>	38
4. Hasil pengamatan zona hambatan dari <i>Lactobacillus bulgaricus</i> dalam media MRSB dengan menggunakan bakteri uji <i>Salmonella thyposa</i>	39
5. <i>Lactobacillus bulgaricus</i> isolat dari dadih yang ditumbuhkan dalam media MRSB	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema kerja penelitian	36
2. Skema Kerja Pengujian Aktivitas Antimikroba	37

BAB I PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat umumnya merupakan kelompok bakteri pembentuk asam laktat, baik sebagai satu-satunya produk atau sebagai produk utama pada metabolisme karbohidrat dan tumbuh pada pH lingkungan yang rendah (1,2). Bakteri asam laktat banyak diisolasi dari makanan hasil fermentasi, seperti dadih yang merupakan susu fermentasi tradisional dari daerah Sumatera Barat dan dipercaya dapat meningkatkan kesehatan dan mencegah timbulnya beberapa penyakit. Pada tahun 1988, Hosono *et al* telah mengisolasi bakteri dari dadih dengan jumlah rata-rata $4,1 \times 10^8$ sel/gram dan diperoleh bakteri asam laktat, salah satunya adalah *Lactobacillus bulgaricus*.(3,4)

Bakteri asam laktat yang sudah diteliti mempunyai aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Salmonella thyposa* adalah *Lactobacillus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbruecki* dan *Streptococcus thermophilus*.(9)

Aktivitas antibakteri dari bakteri asam laktat dikarenakan oleh produksi berbagai jenis metabolit yang bersifat antibakteri, baik berupa senyawa metabolit primer, yaitu asam laktat, asam asetat, hidrogen peroksida, juga senyawa metabolit sekunder yaitu bakteriosin. Waktu inkubasi mempengaruhi senyawa metabolit yang dihasilkan. Bakteriosin sudah mulai dihasilkan pada

fase logaritma, namun dihasilkan dalam jumlah besar setelah mencapai fase stasioner yaitu rata-rata setelah masa inkubasi 24 jam (10).

Dalam penelitian ini digunakan media MRS (DE Man Ragosa and Sharpe) Broth karena media MRSB ini merupakan media selektif pertumbuhan bakteri asam laktat. Media ini juga merupakan media produksi bakteri asam laktat. Hal ini dikarenakan media MRSB merupakan substrat dan mengandung sejumlah nutrisi penting yang dapat dimanfaatkan dalam proses metabolismenya (15)

Permasalahan yang timbul dalam penelitian ini adalah bagaimana efek lama inkubasi dari *Lactobacillus bulgaricus* dalam media MRS (DE Man Ragosa and Sharpe) Broth yang menghasilkan metabolit dengan aktivitas antibakteri. Untuk itu dilakukan penelitian efek lama inkubasi dari *Lactobacillus bulgaricus* dalam media MRS (DE Man Ragosa and Sharpe) Broth terhadap aktivitas antibakteri yang dihasilkan dengan tujuan untuk mengetahui lama inkubasi dari *Lactobacillus bulgaricus* dalam media MRS (DE Man Ragosa and Sharpe) Broth yang menghasilkan metabolit yang mampu menghambat pertumbuhan *Salmonella typhosa* dan *Escherichia coli*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Bakteri Asam Laktat

II.1.1 Uraian Umum Bakteri Asam Laktat

Pada umumnya bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri pembentuk asam laktat, baik sebagai satu-satunya produk atau sebagai produk utama pada metabolisme karbohidrat dan tumbuh pada pH lingkungan yang rendah (1,2). Bakteri asam laktat banyak diisolasi dari makanan hasil fermentasi, seperti dadih yang merupakan susu fermentasi tradisional dari daerah Sumatera Barat dan dipercaya dapat meningkatkan kesehatan dan mencegah timbulnya beberapa penyakit. Pada tahun 1988, Hosono *et al* telah mengisolasi bakteri dari dadih dengan jumlah rata-rata $4,1 \times 10^8$ sel/gram dan diperoleh bakteri asam laktat, salah satunya adalah *Lactobacillus bulgaricus*.(3,4)

Bakteri asam laktat telah banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang yaitu sebagai agen penghasil senyawa antibakteri, agen probiotik dalam bidang kesehatan yang dapat menurunkan kolesterol, menghambat tumor/karsinogenik, dan menstimulir sistem imun. Selain itu juga, probiotik dipercaya dapat mencegah konstipasi, meningkatkan metabolisme mineral terutama kalsium, mengurangi bakteri *Helicobacter pylori* yang menyebabkan infeksi lambung berkepanjangan. Metabolit yang dihasilkan dapat digunakan sebagai pengawet dan pengaroma dalam industri

makanan dan susu, sebagai pelarut dalam industri tekstil, kosmetik, dan elektronik, sebagai bahan baku plastik ramah lingkungan (5,6,7,8).

Kelompok mikroba paling penting dan beragam yang berhubungan dengan makanan dan manusia adalah bakteri. Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang menghasilkan sejumlah besar asam laktat sebagai hasil akhir dari metabolisme karbohidrat. Asam laktat yang dihasilkan tersebut akan menurunkan nilai pH lingkungan pertumbuhannya dan menimbulkan rasa asam. Hal ini juga menghambat pertumbuhan dari beberapa jenis mikroba lainnya. (11,12)

Bakteri asam laktat dapat digolongkan menjadi dua berdasarkan sifat fermentasinya, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Golongan homofermentatif ialah bakteri yang menghasilkan hanya asam laktat dari metabolisme gula, sedangkan golongan heterofermentatif selain asam laktat, juga menghasilkan karbondioksida dan sedikit asam-asam volatile lainnya, serta alkohol dan ester (11,13)

Bakteri asam laktat dapat hidup dan bersaing dengan mikroorganisme lain pada berbagai habitat, seperti tanaman dan berbagai produk makanan, serta saluran pencernaan dan jalur genital pada manusia dan hewan. Sejak berabad-abad yang lalu, bakteri asam laktat telah digunakan secara empiris oleh manusia. Pada saat ini, pemanfaatan bakteri asam laktat dalam industri pangan telah dikenal secara luas karena berpotensi sebagai penghasil berbagai asam organik disamping pada umumnya tidak bersifat patogen (14)



Peranan bakteri asam laktat pada bahan pangan lebih banyak menguntungkan daripada merugikan, bakteri asam laktat telah digunakan secara luas pada prosesing makanan, seperti produk-produk susu, minuman dan daging. Salah satu manfaat bakteri asam laktat yang paling penting adalah menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk atau patogenik dalam makanan. Bakteri ini juga dapat menghasilkan beberapa bahan antibakteri, termasuk asam-asam organik, diasetil dan hidrogen peroksida. Beberapa bakteri asam laktat telah diketahui dapat menghasilkan bakteriosin, yaitu peptida atau protein bakterisida yang aktif secara biologis. Senyawa antimikroba atau bakteriosin telah banyak dimanfaatkan sifat antagonistiknya dalam bidang biopreservatif pangan, kemampuannya dalam menghambat bakteri Gram positif atau Gram negatif dan sebagai terapeutik. Beberapa bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat menghambat pertumbuhan berbagai bakteri patogen yang banyak terdapat dalam makanan, termasuk *Staphylococcus aureus* dan *Listeria monocytogenes* (16,17)

Bakteri asam laktat merupakan jenis bakteri yang umumnya menguntungkan. Bakteri ini banyak memberikan keuntungan sehingga banyak industri makanan fermentasi memanfaatkannya. Keuntungan lain terhadap kesehatan seperti hubungannya dengan tingkat kolesterol darah, kanker dan produksi antimikroba juga telah banyak diteliti dan mendapat perhatian yang terus meningkat. Pada makanan, bakteri asam laktat juga dapat meningkatkan mutu gizinya (18)

II.1.2 Metabolisme Bakteri Asam Laktat (19)

Proses metabolisme mencakup semua reaksi kimia dan biologi yang terjadi di dalam sel mikroba. Metabolisme mikroba terdiri dari dua proses, yaitu: proses katabolisme (proses eksergonik) dimana terjadi pembentukan energi, yang kedua yaitu proses anabolisme (proses endergonik) dimana dibutuhkan energi. Oleh karena itu, di dalam sel mikroorganisme terjadi dua proses utama yaitu produksi energi dari berbagai substrat yang tersedia dan pembentukan intermediat yang dibutuhkan untuk produksi biokimia dan komponen sel lainnya.

Waktu inkubasi sangat mempengaruhi metabolit yang dihasilkan oleh mikroba. Dimana metabolit yang dihasilkan dapat berupa metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit sekunder adalah hasil metabolisme yang tidak merupakan kebutuhan pokok sel mikroba untuk hidup dan tumbuh. Perbedaan antara metabolit primer dan metabolit sekunder pada sel mikroba telah diperkenalkan oleh Bu'hock (1961). Metabolit primer sangat diperlukan oleh sel untuk tumbuh, sedangkan metabolit sekunder mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:

1. Setiap metabolit sekunder adalah spesifik untuk satu atau beberapa spesies
2. Metabolit sekunder diduga tidak diperlukan untuk pertumbuhan sel.
3. Produksi metabolit sekunder sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan.

4. Beberapa spesies mungkin memproduksi beberapa macam metabolit sekunder, sedangkan spesies lainnya mungkin hanya memproduksi satu atau dua macam metabolit sekunder.
5. Banyak metabolit sekunder yang diproduksi sebagai suatu grup dengan struktur hampir sama, dimana komposisinya dipengaruhi oleh medium dan kondisi pertumbuhan.
6. Produksi metabolit sekunder dikontrol oleh mekanisme yang berbeda dengan kontrol dalam metabolit primer.

Salah satu ciri dari metabolit sekunder yaitu komponen tersebut tidak diproduksi pada waktu pertumbuhan sel secara cepat (fase logaritmik atau fase drophophase), tetapi dibentuk pada akhir masa pertumbuhan (indiophase). Produksi metabolit sekunder mungkin mempengaruhi pertumbuhan sel yang memproduksinya. Kemampuan mikroba untuk memproduksi metabolit sekunder mudah hilang karena mutasi.

Fungsi metabolit sekunder di dalam metabolisme mikroba belum diketahui. Di bawah ini dikemukakan beberapa hipotesa mengenai fungsi metabolit sekunder di dalam sel:

1. Metabolit sekunder merupakan penyimpanan dari metabolisme primer.
2. Metabolit sekunder merupakan hasil buangan akhir yang tidak mempunyai fungsi dalam proses biokimia.
3. Metabolit sekunder merupakan metabolit yang mempunyai fungsi penting pada tahap awalnya, tetapi kehilangan fungsinya karena evolusi.

4. Metabolit sekunder merupakan produk dari mekanisme detoksifikasi terhambat.
5. Metabolit sekunder merupakan akibat dari regulasi (pengontrolan) yang lemah dalam metabolisme primer.

Tahap-tahap dalam biosintesa metabolit sekunder adalah sebagai berikut:

1. Penyerapan nutrisi ke dalam sel.
2. Pemecahan nutrisi menjadi intermediat melalui jalur metabolisme primer (glikolisis dan sebagainya)
3. Biosintesa molekul-molekul kecil yang merupakan prekursor dari metabolit sekunder.
4. Modifikasi intermediat tersebut bila perlu.
5. Masuknya prekursor ke dalam jalur biosintesa metabolit sekunder.
6. Modifikasi akhir setelah struktur utama terbentuk.

II.2 Fase-Fase Pertumbuhan Mikroorganisme

Adapun fase-fase dan kurva dari pertumbuhan mikroorganisme adalah sebagai berikut:

II.2.1 Fase lag atau fase adaptasi

Pada fase ini yaitu 1-2 jam setelah pemindahan, bakteri belum mengadakan pembiakan, pertumbuhan individu tidak secara nyata terlihat, karena fase ini dapat dinamakan fase adaptasi (penyesuaian) ataupun fase pengaturan jasad untuk suatu kegiatan dalam lingkungan yang mungkin baru, sehingga bentuk kurva selama fase ini umumnya mendatar.

II.2.2 Fase pertumbuhan yang dipercepat

Mikroorganisme mulai melakukan pembelahan diri, tapi waktu generasinya masih panjang. Fase pertumbuhan dipercepat bersama-sama dengan fase permulaan sering disebut "lag phase" atau "phase of adjustment"

II.2.3 Fase eksponensial/logaritma

Pada fase ini pembiakan bakteri berlangsung sangat cepat, setelah setiap individu menyesuaikan diri dengan lingkungan baru selama fase log, perubahan bentuk dan peningkatan jumlah individu akan terjadi sehingga bentuk kurva meningkat dengan tajam (menanjak). Peningkatan ini harus diimbangi dengan banyak faktor lingkungan antara lain:

1. Lingkungan biologis yaitu bentuk dan sifat jasad asosiasi kehidupan diantara jasad yang ada kalau jumlah dan jenis lebih dan satu.
2. Lingkungan non-biologis antara lain kandungan nutrien dalam media, temperatur, kadar oksigen, cahaya dan sebagainya.

Kalau faktor lingkungan tersebut optimal, peningkatan kurva akan tampak tajam. Jika kita ingin mengadakan biakan yang cepat tumbuh maka bakteri dalam fase ini baik sekali untuk dijadikan inokulum.

II.2.4 Fase pertumbuhan yang mulai terhambat

Merupakan puncak dari fase logaritmik sebelum mencapai fase selanjutnya, dimana penambahan jumlah individu mulai berkurang atau menurun yang disebabkan oleh banyak faktor antara lain berkurangnya sumber nutrien dalam media, tercapainya kejenuhan pertumbuhan jasad

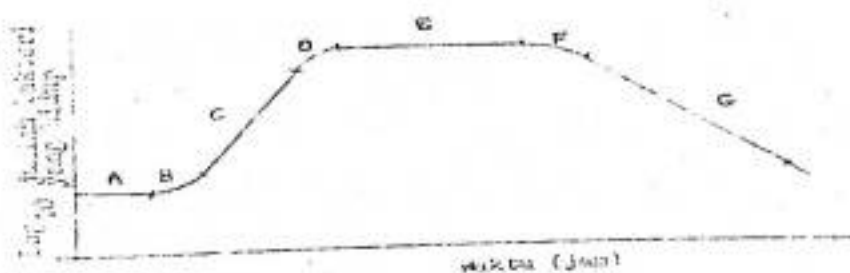
renik dan sebagainya. Bukan karena keadaan medium yang memburuk, karena perubahan pH atau karena bertambahnya limbah kotoran, maka dalam fase berikutnya tampak sekali menyusutnya jumlah sel-sel yang segar, kecepatan berbiak menjadi berkurang sekali sehingga fase ini disebut fase pembiakan diperlambat.

II.2.5 Fase stasioner

Pada fase ini jumlah bakteri yang berbiak sama dengan jumlah bakteri yang mati sehingga kurva menunjukkan garis yang hampir horizontal, fase ini disebut fase konstan.

II.2.6 Fase kematian yang dipercepat dan Fase kematian logaritma

Ini merupakan akhir dan suatu kurva dimana jumlah individu secara tajam akan menurun sehingga kurva tampaknya akan mendekati titik awal kembali. (28, 29). Kedua fase ini disebut fase penurunan kematian. Pada fase ini kecepatan kematian meningkat terus-menerus, sedangkan kecepatan pembelahan menjadi nol. Setelah sampai ke fase kematian logaritma kecepatan kematian mencapai maksimum.



Gambar 7.2. Kurva pertumbuhan mikroorganisme dengan fase-fase pertumbuhannya

- A. Fase penanaman/ adaptasi/ fase lag
- B. Fase pertumbuhan yang dipercepat
- C. Fase logaritma
- D. Fase pertumbuhan yang mulai terhambat
- E. Fase stasioner yang maksimum
- F. Fase kematian yang dipercepat
- G. Fase kematian logaritma

Gambar 1. Kurva pertumbuhan mikroorganisme

Aktivitas antibakteri dari bakteri asam laktat dikarenakan oleh produksi berbagai jenis metabolit yang bersifat antibakteri, baik berupa senyawa metabolit primer, yaitu asam laktat, asam asetat, hidrogen peroksida, juga senyawa metabolit sekunder yaitu bakteriosin. Waktu inkubasi mempengaruhi senyawa metabolit yang dihasilkan. Bakteriosin sudah mulai dihasilkan pada fase logaritma, namun dihasilkan dalam jumlah besar setelah mencapai fase stasioner yaitu rata-rata setelah masa inkubasi 24 jam (10).

II.3 Uraian Umum Antimikroba

Antimikroba adalah obat untuk membasmi mikroba, khususnya mikroba yang bersifat patogen atau mikroba yang dapat merugikan manusia. Masih dikenal berbagai istilah lain disamping antimikroba yaitu antibiotik, kemoterapeutik, antiseptik, desinfektan, sanitizer dan germisid. Antibiotik adalah zat yang dihasilkan oleh suatu mikroba yang dapat menghambat atau dapat membasmi mikroba jenis lain. Dewasa ini banyak antibiotik secara semisintetik atau sintetik penuh (20)

Obat yang digunakan untuk membasmi mikroba penyebab infeksi pada manusia ditentukan harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin, artinya obat tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk mikroba, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes (20)

II.4 Aktivitas dan Spektrum Antimikroba

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroba yang dikenal sebagai aktivitas bakteriostatik; dan ada yang bersifat membunuh mikroba, dikenal sebagai sifat bakterisid.

Sifat antimikroba dapat berbeda satu dengan yang lainnya, misal penisilin G bersifat aktif terutama terhadap bakteri gram-positif, sedangkan bakteri gram-negatif pada umumnya tidak peka (resisten) terhadap penisilin G, streptomisin memiliki sifat yang sebaliknya. Berdasarkan perbedaan sifat ini antimikroba dibagi menjadi dua kelompok, yaitu berspektrum sempit dan berspektrum luas. Walaupun suatu antimikroba berspektrum luas, efektivitas kliniknya belum tentu seluas spektrumnya, sebab efektivitas maksimal diperoleh dengan menggunakan obat terpilih untuk infeksi yang sedang dihadapi terlepas dari efeknya terhadap mikroba lain. (20)

II.5 Mekanisme Kerja Antimikroba

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dapat dibagi dalam lima kelompok, yaitu: 1) yang mengganggu metabolisme sel mikroba; 2) yang menghambat sintesis dinding sel mikroba; 3) yang merusak keutuhan membran sel mikroba; 4) yang menghambat sintesis protein sel mikroba; dan 5) yang menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel mikroba (20)

II.5.1 Antimikroba yang Menghambat Metabolisme Sel Mikroba

Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Berbeda dengan manusia yang mendapatkan asam folat dari luar, mikroba harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Apabila sulfonamid atau sulfon menang bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional. Akibatnya kehidupan mikroba akan terganggu (20,21)

Untuk dapat bekerja, asam folat harus diubah menjadi bentuk aktifnya, yaitu asam tetrahidrofolat (THFA), dalam dua tahap. Pada tahap akhir, enzim dihidrofolat reduktase dihambat oleh trimetropin, sehingga asam dihidrofolat tidak dapat direduktase menjadi THFA yang fungsional. Dengan mekanisme kerja yang demikian diperoleh efek yang bersifat bakteristatik (20,21)

Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini adalah sulfonamid, trimetropin, asam p-aminosalisilat (PAS) dan sulfon (20)

II.5.2 Antimikroba yang Menghambat Sintesis Dinding Sel Mikroba

Secara kimia, dinding sel bakteri adalah polipeptidoglikan, yaitu suatu polimer kompleks mukopeptida (glikopeptida). Sikloserin menghambat reaksi yang paling dini dalam proses sintesis dinding sel. Penisilin dan sefalosporin menghambat reaksi terakhir, yaitu transpeptidasi, dalam rangkaian reaksi tersebut. Oleh karena tekanan osmotik dalam sel mikroba lebih tinggi daripada di luar sel, maka

kerusakan dinding sel mikroba akan menyebabkan terjadinya lisis, yang merupakan dasar efek bakterisidal pada kuman yang peka (20,21)

Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini adalah penisilin, sefalosporin dan sikloserin (20)

II.5.3 Antimikroba yang Mengganggu Keutuhan Membran Sel Mikroba

Polimiksin sebagai senyawa amonium-kuaterner dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel mikroba. Antibiotik polien bereaksi dengan struktur sterol yang terdapat pada membran sel fungi, sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif membran tersebut. Bakteri tidak sensitif terhadap antibiotik polien, karena tidak memiliki struktur sterol pada membran selnya. Sedangkan antiseptik surfaktan bekerja dengan mengubah tegangan permukaan (*surface-active agents*), sehingga dapat merusak permeabilitas selektif dari membran sel mikroba. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba, seperti protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain, yang pada akhirnya sel mikroba menjadi lisis (20,21)

Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini adalah polimiksin dan golongan polien serta berbagai antimikroba kemoterapeutik seperti antiseptik *surface-active agents* atau surfaktan (20)

II.5.4 Antimikroba yang Menghambat Sintesis Protein Sel Mikroba

Sel mikroba dalam kehidupannya perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri atas dua sub unit, yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Agar dapat berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Penghambatan sintesis protein terjadi dengan berbagai cara. Sebagai contoh, streptomisin berikatan dengan komponen ribosom 30S, menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein. Akibatnya terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel mikroba. Eritromisin berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida. Akibatnya rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena lokasi asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru (20,21)

Antimikroba yang termasuk dalam golongan ini adalah streptomisin, eritromisin dan kloramfenikol (20)

II.5.5 Antimikroba yang Menghambat Sintesis atau Merusak Asam Nukleat Sel Mikroba

Antimikroba yang memiliki mekanisme kerja ini pada umumnya kurang mempunyai sifat toksisitas selektif, karena bersifat sitotoksik terhadap sel tubuh hospes. Oleh sebab itu, hanya yang sifat sitotoksiknya

masih dapat diterima yang bermanfaat sebagai antimikroba, seperti rifampisin dan griseofulvin. Antimikroba yang lainnya, karena sifat sitotoksitasnya, pada umumnya hanya digunakan sebagai obat antikanker (20)

Rifampisin berikatan dengan enzim polimerase-RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Sedang griseofulvin bekerja dengan meletakkan diri pada lipid sel, sehingga memperpanjang masa sintesis DNA dan meningkatkan jumlah asam nukleat tersebut dalam sel bersangkutan (20,21)

II.6 Pengukuran Aktivitas Antimikroba (22,23,24)

II.6.1 Cara pengenceran (Dilution Methods)

Metode ini menggunakan teknik tabung pengenceran. Penghambatan pertumbuhan (berkurangnya kekeruhan) yang dihasilkan oleh sampel yang diuji terhadap pertumbuhan mikroba dapat diukur dengan alat spektrofotometer. Prinsip kerjanya yaitu energi cahaya yang mengenai zat-zat mikroorganisme didalam sampel suspensi mikroba akan dihamburkan, sedangkan cahaya yang diteruskan diubah oleh tabung fotoelektrik menjadi energi listrik yang dicatat oleh galvanometer sebagai persen transmittan (%T). Semakin sedikit jumlah sel didalam suspensi, makin besar intensitas cahaya yang lolos, dan makin tinggi pula persen transmittan yang dicatat.

II.6.2 Cara difusi

Cara difusi adalah proses perembesan larutan contoh pada media. Pada metode ini kemampuan zat antimikroba ditentukan berdasarkan daerah hambatan yang dibentuk oleh larutan contoh terhadap pertumbuhan dari mikroba pada media tersebut.

Beberapa modifikasi dari cara ini adalah:

II.6.2.1 Cara difusi kertas saring

Menggunakan kertas saring yang berukuran 10 mm dengan ukuran yang sama dengan diameter silinder pipih dimana agarnya terlebih dahulu dituang kedalam cawan petri kemudian kertas saring diletakkan diatas permukaan agar yang telah diinokulasikan dengan mikroba tertentu. Kertas saring diberi cairan antibiotik. Setelah diinkubasikan terbentuk daerah hambatan disekeliling kertas yang ditunjukkan dengan zona bening disekelilingnya.

II.6.2.2 Cara difusi dengan silinder pipih

Agar cair dimasukkan dengan organisme antagonis ke dalam cawan petri. Setelah itu dimasukkan lempengan silinder dan ditempatkan pada permukaan media lalu diisi dengan cairan antibiotik. Disekitar silinder setelah inkubasi akan memperlihatkan zona bening yang merupakan zona hambatan

II.6.2.3 Cara dengan cara Kirby Bauer

Menggunakan lempengan antibiotik kertas filter yang berkekuatan tinggi yang diletakkan pada medium agar Mueller Hilton yang permukaannya dioles organisme uji. Setelah inkubasi, garis tengah daerah penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh antibiotik terlihat sebagai wilayah bening diatas kertas.

II.6.2.4 Cara difusi dengan cara agar berlapis

Cara ini merupakan modifikasi dari cara Kirby Bauer. Perbedaannya dengan menggunakan 2 lapis agar, lapisan pertama ini tidak mengandung bakteri (*base layer*) sedangkan lapisan kedua ini mengandung bakteri yang tidak dicampurkan dalam media agar (*seed layer*).

II.7 Uraian Bakteri

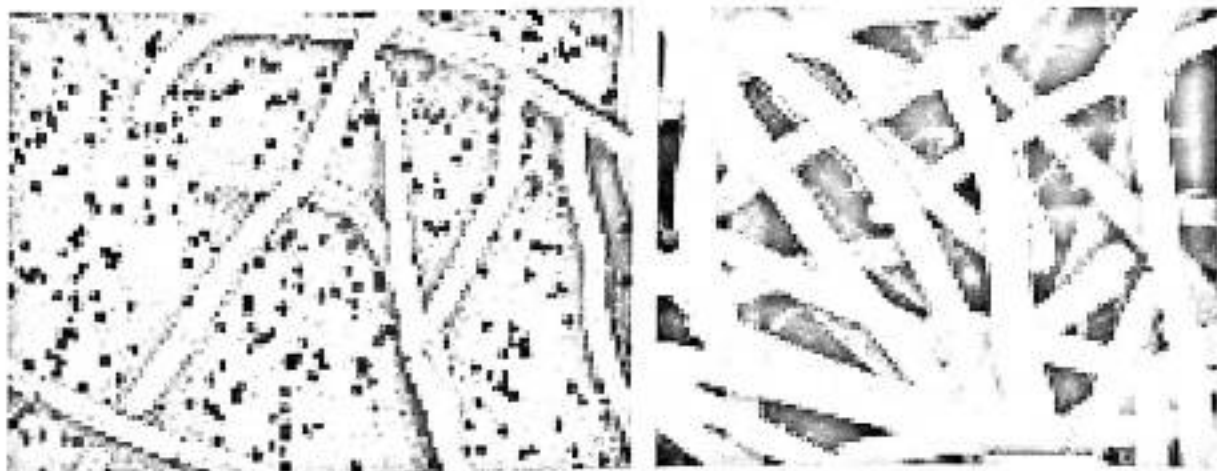
II.7.1 *Lactobacillus bulgaricus*

a. Klasifikasi (25)

Kingdom	: Bacterium
Divisio	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Ordo	: Lactobacillales
Famili	: Lactobacillaceae
Genus	: Lactobacillus
Spesies	: <i>Lactobacillus bulgaricus</i>

b. Sifat dan Morfologi

Lactobacillus bulgaricus merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang dan tidak membentuk endospora. Dalam susu, bakteri ini akan mengubah laktosa menjadi asam laktat. Bakteri ini bersifat termodurik dan homofermentatif, dengan suhu optimum untuk pertumbuhannya sekitar 45°C, kondisi optimum untuk pertumbuhannya adalah sedikit asam atau sekitar pH 5,5 - 6,2, pertumbuhan umumnya terjadi sampai pH mencapai 5,0 atau kurang dari 5,0 dan laju pertumbuhan menurun dalam suasana awal media yang bersifat basa. *Lactobacillus bulgaricus* bersifat mikroaerofilik, mereduksi nitrat, tidak mendigesti gelatin dan kasein, tetapi sejumlah kecil sumber nitrogen terstrain, tidak memproduksi indol dan H₂S.(25) Manfaat *Lactobacillus bulgaricus* adalah berperan dalam mengurangi gangguan pencernaan, dilibatkan dalam peningkatan dari efisiensi pencernaan manusia, berperan dalam imunoregulation, membantu metabolisme lemak dan membantu mengendalikan kolesterol, membantu mengurangi perkembangbiakan bakteri jahat dalam usus.



Gambar 2. *Lactobacillus bulgaricus* (25)

II.7.2 *Escherichia coli*

a. Klasifikasi

kingdom	: Procaryotae
Divisio	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

b. Sifat dan morfologi

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif berbentuk batang lurus dengan 1,1 – 1,5 μm dan bersifat motil dengan flagel peritrikus. Bakteri ini memiliki 2 tipe metabolisme yaitu dengan respirasi dan fermentasi serta fakultatif anaerobik yang tumbuh optimal pada suhu 37°C. Bakteri ini merupakan penghuni flora usus manusia dan hewan berdarah panas yang pada kondisi tidak menguntungkan populasinya dapat meningkat sehingga dapat bersifat patogen. Oksidase negatif dan asetat dapat digunakan sebagai sumber karbon satu – satunya tetapi sitrat tidak dapat digunakan. Piruvat dihasilkan dengan fermentasi glukosa dan karbohidrat lainnya, yang selanjutnya akan diubah menjadi laktid, asetat dan asam formik. Responnya terhadap benda asing yaitu dengan membentuk antigen O, K dan H sebagai respon terhadap kondisi yang kurang

menguntungkan dengan perkembangan kapsul sehingga dapat bersifat virulen dan tidak dapat dinetralsir.

II.7.3 *Salmonella thyposa*

a. Klasifikasi(27,28)

kingdom : Procaryotae
Divisi : Proteobacteria
Kelas : Gammaproteobacteria
Bangsa : Enterobacteriales
Suku : Enterobacteriaceae
Marga : Salmonella
Species : *Salmonella thyposa*

b. Sifat dan morfologi

Salmonella thyposa merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang berukuran 2 sampai 4 μ x 0,6 μ , bergerak dengan flagel peritrik (kecuali *Salmonella gallinarium* dan *Salmonella pullorium*). Tidak bersimpai dan tidak berspora, tetapi memiliki fimbria. Bakteri ini bersifat aerob dan anaerob fakultatif. Suhu optimum pertumbuhannya adalah 37°C dan pH optimumnya 6-8 dan dapat meragikan glukosa, manitol dan maltosa dengan disertai pembentukan asam dan gas, kecuali *Salmonella thyposa* yang hanya membuat asam tanpa pembentukan gas. Tidak membentuk indol, tetapi reaksi metil merah positif. Tidak menghidrolisiskan urea dan membentuk H₂S. Dapat ditemukan pada usus manusia dan binatang. Kadang-kadang makanan (telur dan daging)

dapat tercemar oleh bakteri ini. Bakteri ini dapat menyebabkan penyakit tipus perut (*tryphus abdominalis*), demam enterik, gastroenteritis dan septikemia.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium foil, autoklaf (allamerican), botol pengencer, botol semprot, cawan petri, gelas erlenmeyer 100 ml, gelas ukur 100 ml, inkubator (Memmert), jangka sorong, kapas, kertas saring, kompor gas, Laminar Air Flow (LAF), lampu spiritus, oven (WEB binder), sentrifuge (Digisystem Laboratory Instrument), ose bulat, pinset, rak tabung, spektrofotometer (model 340), spoit, tabung reaksi, tabung sentrifuge, timbangan analitik (Chyo JL-200)

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alkohol 70%, air suling, medium NA (Nutrient Agar), medium MRS (DE Man, Ragosa, and Sharpe) Broth, Ekstrak Yeast, medium MHA (Mueller Hinton Agar), NaCl 0,9 %, biakan mumi *Salmonella thyposa*, biakan mumi *Escherichia coli*, *Lactobacillus bulgaricus* dari dadih. (Koleksi Laboratorium Mikrobiologi Farmasi).

III.2 Metode Kerja

III.2.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang digunakan seperti cawan petri, tabung reaksi, tabung sentrifuge, gelas ukur, gelas erlenmeyer dan gelas kimia disterilkan

dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Sedangkan alat-alat tidak tahan panas disterilisasi basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm, selama 15 menit. Sedangkan ose dan pinset disterilkan dengan cara pemijaran diatas lampu spiritus.

III.3 Pembuatan Larutan

III.3.1 Pembuatan Larutan NaCl 0,9 %

NaCl ditimbang sebanyak 0,9 g, kemudian dilarutkan dengan air suling hingga 100 ml.

III.4 Pembuatan Medium

III.4.1 Pembuatan Medium NA

Komposisi : ekstrak daging 0,3%, pepton 0,5%, agar 1,5%, air suling 1000 ml, pH $7,4 \pm 0,2$.

Cara pembuatan : bahan – bahan diatas ditimbang untuk 50 ml medium, dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer, dilarutkan dengan 50 ml air suling, dipanaskan hingga larut, selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atmosfer selama 1 jam.

III.4.2 Pembuatan Medium MRSB(DE Man Ragosa and Sharpe) Broth

Komposisi: Bacteriological peptone 10,0 g, yeast extract 4,0 g, tween-80 1,0 g, sodium acetat 5,0 g, dan magnesium sulfat 0,2 g.

Cara pembuatan: bahan-bahan ditimbang untuk 20 ml medium, dimasukkan kedalam gelas erlenmeyer, dilarutkan dengan 20 ml air suling,

lalu dicek pH 6,5, selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atmosfer selama 15 menit.

III.4.3 Pembuatan Medium MHA (Mueller Hinton Agar)

Komposisi: Ekstrak Beef 300 g, hidrolisat kasein 17,5 g, pati 1,5 g, agar 17,0 g, air suling ad 100 ml.

Cara pembuatan: bahan-bahan diatas ditimbang untuk 100 ml medium, dimasukkan kedalam labu erlenmeyer, dilarutkan dengan 100 ml air suling, lalu dicek pH 6,5, selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atmosfer selama 15 menit.

III.5 Penyiapan Sampel

III.5.1 Peremajaan *Lactobacillus bulgaricus*

Isolat *Lactobacillus bulgaricus* diambil 1 ose, kemudian diinokulasikan dengan cara diinokulasikan pada medium MRSB yang ditambah dengan Ekstrak Yeast, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2 X 24 jam.

III.5.2 Pembuatan Suspensi *Lactobacillus bulgaricus*

Isolat *Lactobacillus bulgaricus* disuspensikan dalam NaCl 0,9% dengan menggunakan ose bulat, kemudian diukur transmitannya pada 25% menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm. Sebagai blanko digunakan larutan NaCl 0,9%.

III.5.3 Produksi Metabolit *Lactobacillus bulgaricus* (Larutan Uji)

Dipipet 0,5 ml suspensi *Lactobacillus bulgaricus*, lalu diinokulasikan kedalam 5 ml medium MRSB yang ditambah dengan Ekstrak Yeast, kemudian diinkubasi dengan variasi waktu inkubasi selama 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam. Selanjutnya disentrifus selama 15 menit, 5000 rpm untuk memisahkan sel bakteri dan supernatan (metabolit yang mengandung senyawa antimikroba). Lapisan atas diambil (supernatan) untuk uji aktivitas antibakteri.

III.6 Penyiapan Bakteri Uji

III.6.1 Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri uji diambil 1 ose, kemudian diinokulasikan dengan cara digoreskan pada medium NA miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

III.6.2 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri uji yang telah diremajakan disuspensikan dalam larutan NaCl 0,9% steril dengan menggunakan ose bulat, kemudian diukur transmitannya pada 25% menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm. Sebagai blanko digunakan larutan NaCl 0,9%.

III.6.3 Prosedur Uji Aktivitas Antibakteri

Sebanyak 15 ml medium MHA steril dituang secara aseptis kedalam cawan petri, dibiarkan memadat sebagai base layer. Kemudian di atasnya ditambahkan 5 ml medium MHA dengan 1 ml suspensi bakteri uji, dibiarkan setengah memadat sebagai seed layer. Lima buah paper disk yang

sebelumnya telah ditetesi dengan larutan uji sebanyak 20 μ L diletakkan sedemikian rupa dalam medium uji secara aseptis hingga jarak antara paper disk \pm 30 mm. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2 x 24 jam.

III.7 Pengamatan

Pengamatan dilakukan setelah inkubasi selama 1-2 x 24 jam dengan mengukur diameter zona hambatan dengan menggunakan jangka sorong.

III.8 Pengumpulan Data

Data dikumpulkan dengan mengukur zona hambatan yang terbentuk pada masing-masing waktu inkubasi terhadap bakteri uji yang digunakan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV. 1 Hasil Penelitian

Hasil penelitian Efek lama inkubasi dari *Lactobacillus bulgaricus* dalam media MRS (DE Man Ragosa and Sharpe) Broth terhadap aktivitas antibakteri yang dihasilkan setelah diinkubasi selama 1x24 jam adalah sebagai berikut :

1. Aktivitas penghambatan terhadap *Escherichia coli*
 - a. Diameter zona hambat rata-rata pada masa inkubasi 12 jam = 10,6 mm
 - b. Diameter zona hambat rata-rata pada masa inkubasi 24 jam = 10,3 mm
 - c. Diameter zona hambat rata-rata pada masa inkubasi 36 jam = 9,6 mm
 - d. Diameter zona hambat rata-rata pada masa inkubasi 48 jam = 13,3 mm
2. Aktivitas penghambatan terhadap *Salmonella thyposa*
 - a. Diameter zona hambat rata-rata pada masa inkubasi 12 jam = 11,0 mm
 - b. Diameter zona hambat rata-rata pada masa inkubasi 24 jam = 10,5 mm

- c. Diameter zona hambat rata-rata pada masa inkubasi 36 jam = 11,5 mm
- d. Diameter zona hambat rata-rata pada masa inkubasi 48 jam = 15,4 mm

IV.2 Pembahasan

Dalam penelitian isolat *Lactobacillus bulgaricus* dari dadih dilakukan dengan menumbuhkannya dalam medium MRSB ditambahkan dengan 0,5% Ekstrak yeast kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan variasi waktu inkubasi 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam. Medium MRSB ini merupakan medium selektif pertumbuhan bakteri asam laktat. Medium ini juga merupakan medium produksi bakteri asam laktat. Hal ini dikarenakan medium MRSB merupakan substrat dan mengandung sejumlah nutrisi penting yang dapat dimanfaatkan dalam proses metabolismenya(15). Ekstrak yeast berguna sebagai sumber nitrogen bagi pertumbuhan bakteri.

Pertumbuhan bakteri asam laktat dapat diamati dengan terbentuknya koloni putih yang dikelilingi zona bening, karena asam laktat yang dihasilkan bereaksi dengan kalsium karbonat yang tidak larut dalam medium membentuk kalsium laktat yang dapat larut dalam air sehingga terbentuk zona bening.

Hasil pengukuran diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* menunjukkan hasil inkubasi 12 jam mulai memberikan aktivitas antibakteri yaitu dengan diameter rata-rata 10,6 mm, hasil



inkubasi 24 jam diameter rata-ratanya 10,2 mm, hasil inkubasi 36 jam dengan diameter rata-rata 9,6 mm. Aktivitas antibakteri dari metabolit sekunder ini semakin jelas oleh diameter daya hambat yang ditunjukkan oleh hasil inkubasi 48 jam yaitu dengan diameter rata-rata 13,3 mm. Hasil pengukuran diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri *Salmonella thyposa* menunjukkan hasil inkubasi 12 jam 11,0 mm, hasil inkubasi 24 jam dengan diameter rata-rata 10,5 mm, hasil inkubasi 36 jam 11,4 mm dan hasil inkubasi 48 jam dengan diameter rata-rata 15,4 mm. Hal ini dikarenakan bakteriosin terakumulasi dalam jumlah yang semakin besar sejalan dengan pertumbuhan bakteri yang menuju ke fase kematian, dimana pada fase ini kecepatan kematian meningkat terus-menerus, sedangkan kecepatan pembelahan menjadi nol. (28, 29)

Sedangkan berdasarkan hasil analisis statistik dengan metode Rancangan Acak Kelompok (RAK) diperoleh data yang berbeda sangat nyata, ini berarti adanya variasi lama inkubasi memberikan efek antibakteri terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dan *Salmonella thyposa*. Hal ini dapat dilihat pada tabel anava yang menunjukkan bahwa antara F_{Hitung} lebih besar dari F_{Tabel} pada taraf 1% dan 5%.

Setelah dilakukan uji lanjut Duncan, pada lama inkubasi 12 jam diperoleh data yang berbeda nyata pada taraf 5%, sedangkan pada lama inkubasi 24 jam dan 36 jam data menunjukkan berbeda tidak nyata pada taraf 5%, hal ini berarti tidak ada perbedaan antara lama inkubasi 24 jam

dan 36 jam, namun berbeda pada lama inkubasi 12 jam dan 48 jam. Ini dapat dilihat pada tabel uji Duncan.

Aktivitas antibakteri dari bakteri asam laktat dikarenakan oleh produksi berbagai jenis metabolit yang bersifat antibakteri, baik berupa senyawa metabolit primer yaitu asam laktat, asam asetat, hidrogen peroksida dan juga berupa senyawa metabolit sekunder yaitu bakteriosin. Bakteriosin merupakan substansi protein, umumnya mempunyai berat molekul kecil serta memiliki aktivitas sebagai bakterisidal. Senyawa antimikroba atau bakteriosin telah banyak dimanfaatkan sifat antagonistiknya dalam bidang biopreservatif pangan, kemampuannya dalam menghambat bakteri gram positif dan atau gram negatif dan sebagai terapeutik. Dimana lama inkubasi mempengaruhi senyawa metabolit yang dihasilkan. Bakteriosin sudah mulai dihasilkan pada fase logaritma(10), pada fase ini pembiakan bakteri berlangsung sangat cepat setelah setiap individu menyesuaikan diri dengan lingkungan baru selama fase lag, perubahan bentuk dan peningkatan jumlah individu akan terjadi (28,29), namun dihasilkan dalam jumlah besar setelah mencapai fase stasioner yaitu rata-rata setelah masa inkubasi 24 jam(10). Pada fase ini jumlah bakteri yang hidup sama dengan jumlah bakteri yang mati sehingga kurva menunjukkan garis yang hampir horizontal dan fase ini disebut fase konstan atau stasioner(28,29)

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

1. Metabolit dari *Lactobacillus bulgaricus* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella thyposa*.
2. Aktivitas antibakteri yang menunjukkan penghambatan paling tinggi adalah pada lama inkubasi 48 jam dengan diameter zona hambatan rata-rata untuk *Escherichia coli* 13,30 mm dan *Salmonella thyposa* 15,43 mm.

V.2 Saran

Disarankan agar dilakukan isolasi metabolit yang dihasilkan oleh *Lactobacillus bulgaricus* isolat dadih

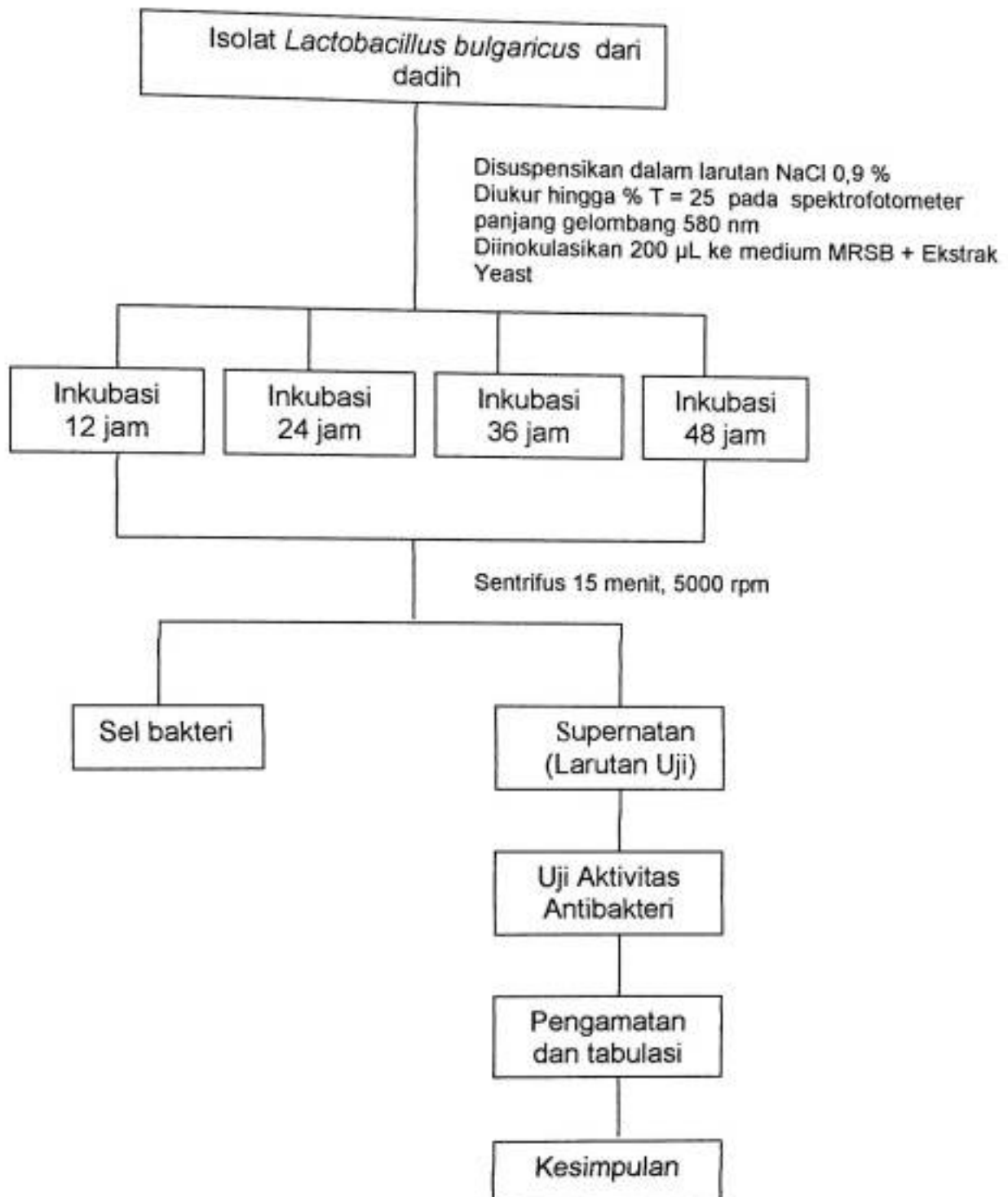
DAFTAR PUSTAKA

1. Dwyana, Z. 2005. *Pemanfaatan Bakteri Asam Laktat dalam Bidang Pangan dan Kesehatan*. Makalah disajikan dalam Kursus Singkat Pemanfaatan Bakteri Asam Laktat dalam Bidang Pangan dan Kesehatan bagi Staf Akademik PTN Kawasan Timur Indonesia. Universitas Hasanuddin dan Ditjen Dikti, Depdiknas. Lembaga Penelitian Unhas.
2. Djide, M.N., 2005. *Uraian Umum tentang Bakteri Asam Laktat*. Makalah disajikan dalam Kursus Singkat Pemanfaatan Bakteri Asam Laktat dalam Bidang Pangan dan Kesehatan bagi Staf Akademik PTN Kawasan Timur Indonesia. Universitas Hasanuddin dan Ditjen Dikti, Depdiknas. Lembaga Penelitian Unhas.
3. Darnys, R. dkk., 1991. *Makanan: Wujud, Variasi dan Fungsinya serta Cara Penyajiannya di Daerah Sumatera Barat*. Dirjen Kebudayaan Direktorat Sejarah dan Nilai Tradisional Depdikbud, Jakarta
4. Hosono, A. et al, 1989. *Microbial Flora in 'Dadih', a Traditional Fermented Milk in Indonesia*. J. Lebensm.-Wiss.u-Technol. 22 : 20-24
5. Sartini. 2005. *Pemanfaatan Bakteri Asam Laktat sebagai Antimikroba dan Teknik Pengujian Aktivitas Antimikrobanya*. Makalah disajikan dalam Kursus Singkat Pemanfaatan Bakteri Asam Laktat dalam Bidang Pangan dan Kesehatan bagi Staf Akademik PTN Kawasan Timur Indonesia. Universitas Hasanuddin dan Ditjen Dikti, Depdiknas. Lembaga Penelitian Unhas.
6. Purwoko, T., & Pramudyanti, I.R. 2004. Pengaruh CaCO₃ pada Fermentasi Asam Laktat Oleh *Rhizopus oryzae*. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. **9 (1)**: 19
7. Kusumawati, N. 2004. Seleksi Bakteri Asam Laktat Indigenus sebagai Galur Probiotik dengan Kemampuan Menurunkan Kolesterol. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. **9 (1)**: 19
8. Gsianturi. 2002. *Probiotik dan Prebiotik untuk Kesehatan*. <http://www.republika.co.id>, diakses 08 April 2008
9. Anggraini, A. 2006. *Kajian Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat hasil Isolasi dari Dadih terhadap Pertumbuhan Salmonella thyposa*. <http://www.republika.co.id>, diakses 04 April 2008

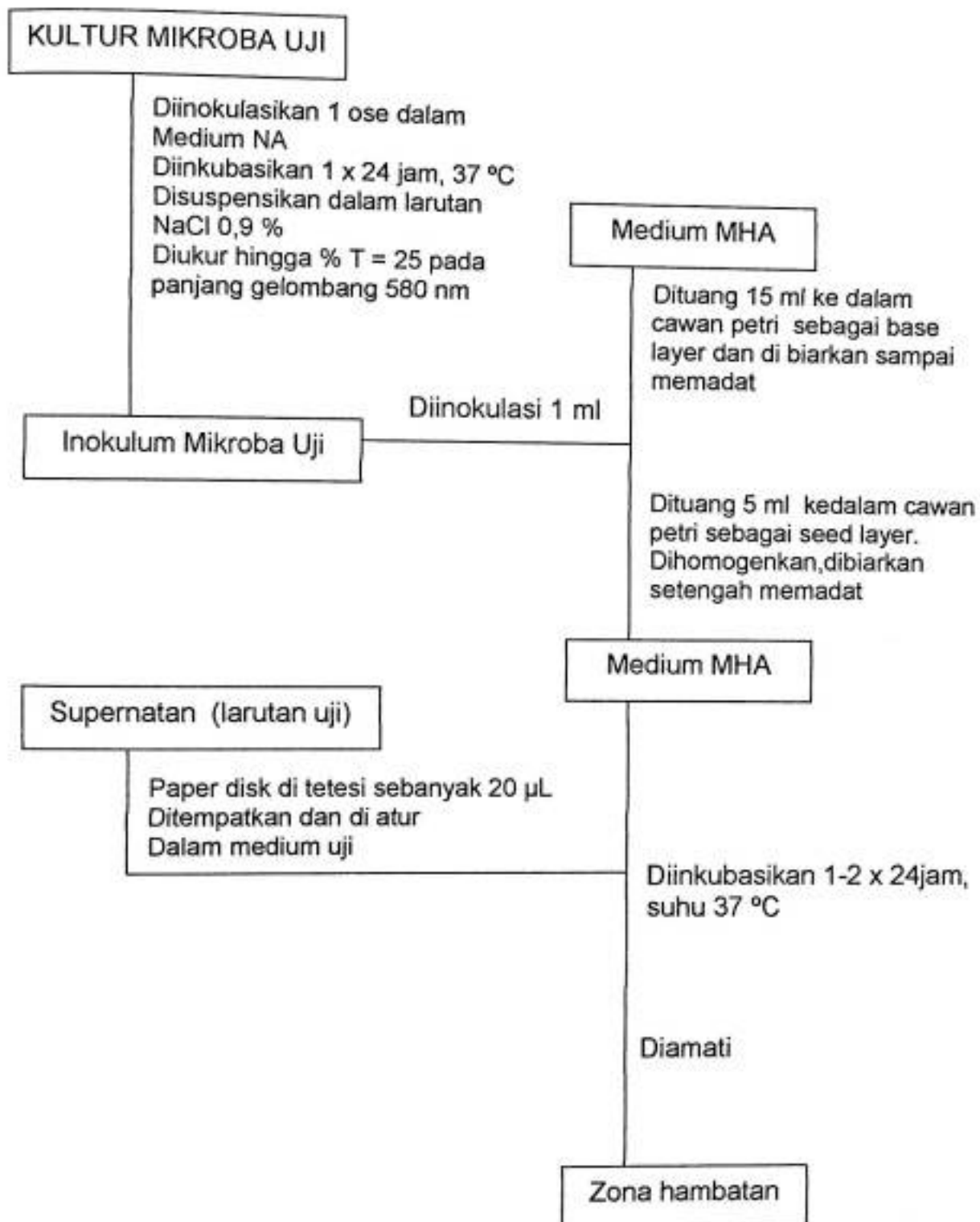
10. Surono, I.S. 2004. *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan*. YAPMMI. Jakarta. 4-11
11. Buckle, K.A. et al, 1978. *Food Science*. Australian Vice-Chancellors Committee Press Etching Pty Ltd., Brisbane. 139
12. Stamer, J.R, 1979. The Lactic Acid Bacteria: Microbes of Diversity. *J. Food Technol.*,1, 60-65
13. Daeschel, A.M. 1989. Antimicrobial Substances from Lactic Acid Bacteria for Use as Food Preservatives. *J. Food Technol.*, 43(1) :164-169
14. Dicks, L.M.T. 1997. *Biotechnology in the Feed Industry*. Farnham Royal Bucks England, London. 26-27
15. Moriarty. D, 1999. Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria. Brylinsky M, Johnson-Green P (editor) Proceeding of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial, Canada.
16. Kato, T. et al. 1993. Isolation of *Enterococcus faecium* with Antibacterial Activity and Characterization of Its Bacteriocin. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 (4): 551-556
17. Tahara, T. et al. 1996. Isolation Partial Characterization and Mode of Action Acidocin J1132, a Two-component Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Appl. Environ. Microbiol*, 62: 892-897
18. Siswono. 2005. *Makanan Fermentasi Tradisional Tetap Menyehatkan*. <http://kompas.co.id>, diakses 02 Mei 2008
19. Fardiaz, S. 1988. *Fisiologi Fermentasi*. Pusat Antar Universitas IPB Lembaga Sumberdaya Informasi. IPB, Bogor. 46
20. Gan, S. 1989. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi Ketiga. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. 571-573
21. Wattimena, J.R. dkk. 1991. *Farmakodinamik dan Terapi Antibiotik*. Gajah Mada University Press, Yogyakarta. 379-381
22. Volk, W.A & Wheeter M.F. 1993. *Mikrobiologi Dasar. Jilid 1*, Soenarto Adisoemarto. 36

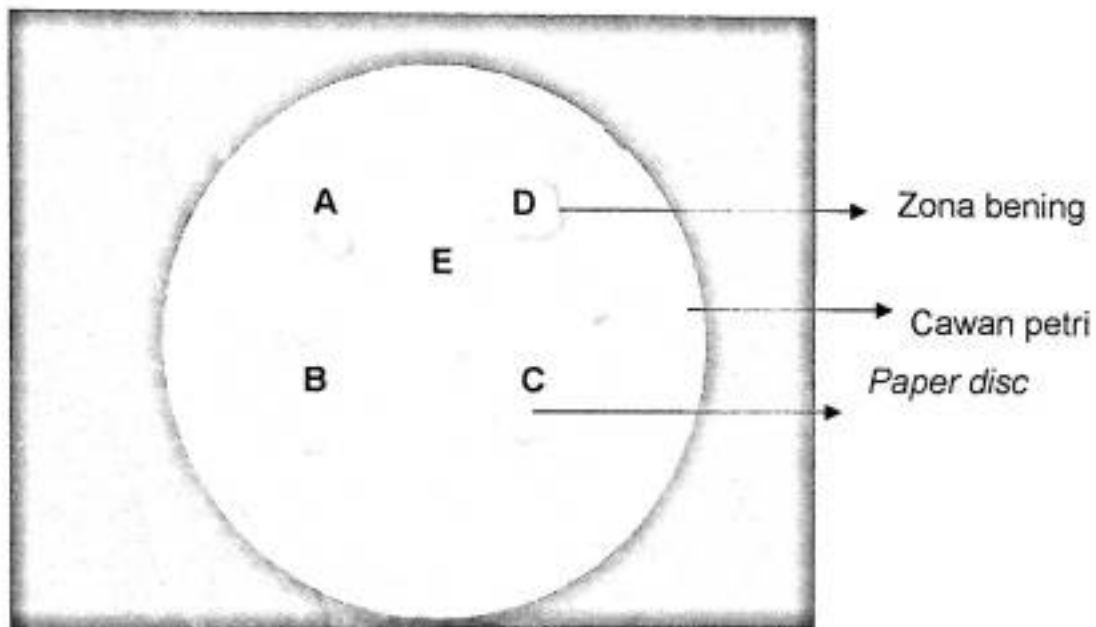
23. Cappucino, J.G & Sherman, N. 1992. *Microbiology a Laboratory Manual*. Eddision-Wesley Company Menk Park, California. 59
24. Baker, F.J. 1967. *Handbook of Bacteriological Technique*. Edition II. Butterworth, London. 81
25. Anonim. tanpa tahun. *Klasifikasi dan Morfologi Lactobacillus bulgaricus*. <http://id.wikipedia.org/wiki>, diakses 08 Mei 2008.
26. Buchanan, R.E & Gibbons, N.E. 1974. *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*. 8th edition. The Williams & Wilkins Company USA 293, 484-489
27. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 1995. *Farmakope Indonesia, Edisi IV*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 89
28. Koesirianto. 2007. *Mikrobiologi, Menguak Dunia Mikroorganisme*, Jilid 1. penerbit Yrama Widya, Margahayu Permai, Bandung. 147-148.
29. Suriawiria. U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Penerbit Papas Sinar Sinanti, Jakarta. 89-91.

Lampiran 1. Skema Kerja



Lampiran 2. Skema Kerja Pengujian Aktivitas Antimikroba

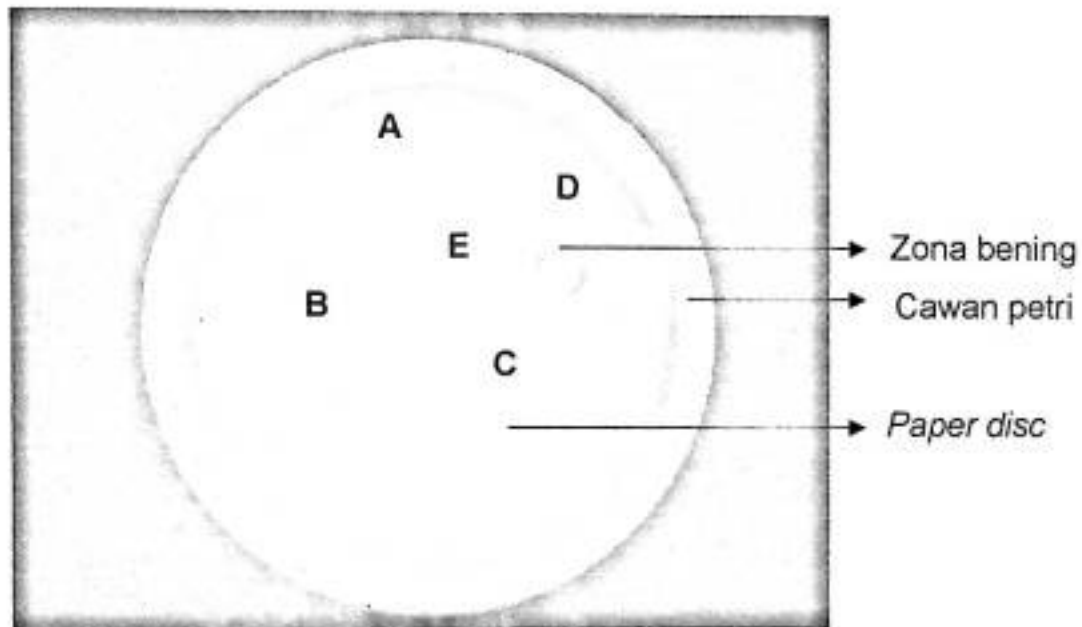




Gambar 3. Hasil pengamatan zona hambat dari *Lactobacillus bulgaricus* dalam media MRSB (DE Man Ragosa and Sharpe Broth) dengan menggunakan bakteri uji *Escherichia coli*.

Keterangan:

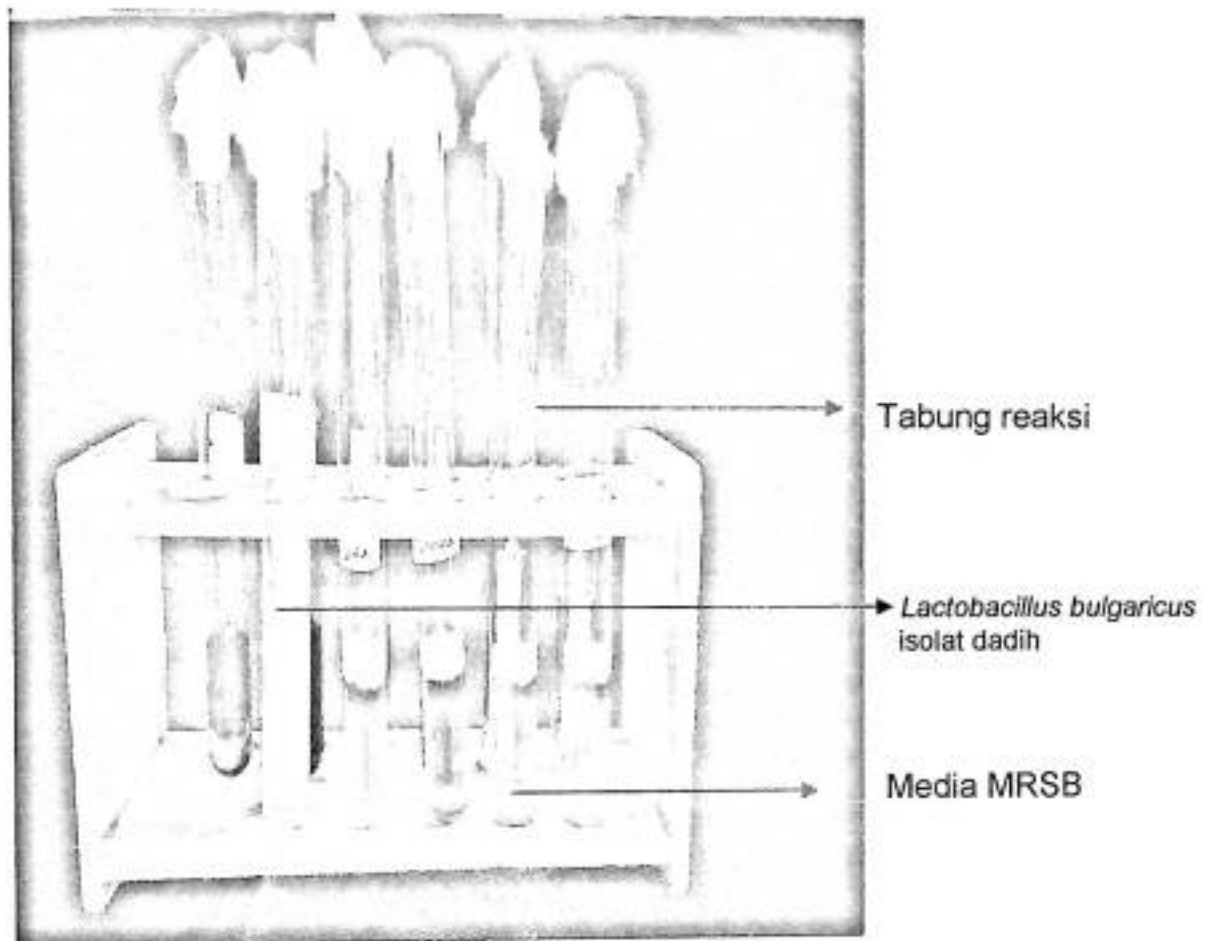
- A = Lama inkubasi 12 jam
- B = Lama inkubasi 24 jam
- C = Lama inkubasi 36 jam
- D = Lama inkubasi 48 jam
- E = Kontrol



Gambar 2. Hasil pengamatan zona hambat dari *Lactobacillus Bulgaricus* dalam media MRSB (DE Man Ragosa and Sharpe Broth) dengan menggunakan bakteri uji *Salmonella Thyposa*.

Keterangan :

- A = Lama inkubasi 12 jam
- B = Lama inkubasi 24 jam
- C = Lama inkubasi 36 jam
- D = Lama inkubasi 48 jam
- E = Kontrol



Gambar 3. *Lactobacillus bulgaricus* isolat dari dadih yang ditumbuhkan dalam media MRSB (DE Man Ragosa and Sharpe Broth)

Lampiran 3. Diameter daya hambat *Lactobacillus bulgaricus* dalam media DE Man Ragosa and Sharpe Broth terhadap aktivitas antibakteri yang dihasilkan.

Bakteri Uji	Waktu Inkubasi				
	12 jam	24 jam	36 jam	48 jam	Jumlah Kelompok
<i>Eschericia coli</i>	10,6	10,4	10,3	14,5	45,8
	10,5	10,2	9,2	12,2	42,1
	10,8	10,2	9,4	13,2	43,6
Σ	31,9	30,8	28,9	39,9	131,5
Rata-rata	10,6	10,3	9,6	13,3	43,83
<i>S. thyposa</i>	10,5	10,4	10,7	18,2	49,8
	11,2	10,5	12,6	13,6	47,9
	11,4	10,7	11,1	14,5	47,7
Σ	33,1	31,6	34,4	46,3	145,4
Rata-rata	11,03	10,5	11,5	15,4	48,5
Total Jumlah	65	62,4	63,3	86,2	276,9
Rata-rata	10,8	10,4	10,6	14,3	46,1

FK(Faktor Koreksi)

$$FK = \frac{(\text{jumlahtotal})^2}{24}$$

$$= \frac{(276)^2}{24} = \frac{76673,6}{24} = 3194,7$$

JKT(Jumlah Kuadrat Total)

$$JKT = (10,6^2 + 10,4^2 + 10,3^2 + 14,5^2 + \dots + 14,5^2) - FK$$

$$= 3289,4 - 3194,7$$

$$= 94,7$$

JKP(Jumlah Kuadrat Perlakuan)

$$\begin{aligned}
 JKP &= \frac{(62,5^2 + 62,4^2 + 63,3^2 + 86,2^2)}{2 \times 3} - FK \\
 &= \frac{19556,1}{6} - 3194,7 \\
 &= 3259,3 - 3194,7 \\
 &= 64,6
 \end{aligned}$$

JKK(Jumlah Kuadrat Kelompok)

$$\begin{aligned}
 JKK &= \frac{(131,5^2 + 145,4^2)}{4 \times 3} - FK \\
 &= \frac{38433,4}{12} - 3194,7 \\
 &= 3202,8 - 3194,7 \\
 &= 8,1
 \end{aligned}$$

JKG(Jumlah Kuadrat Galat)

$$\begin{aligned}
 JKG &= JKT - JKP \\
 &= 94,7 - 64,6 \\
 &= 30,1
 \end{aligned}$$

Derajat Bebas (DB)

- DB Perlakuan = 4 - 1 = 3
- DB Kelompok = 2 - 1 = 1
- DB Total = 24 - 1 = 23
- DB Galat = DB Total - DB Perlakuan - DB Kelompok
= 23 - 3 - 1 = 19

Kuadrat Tengah (KT)

$$\text{- KT Perlakuan} = 64,6 / 3 = 21,5$$

$$\text{- KT Kelompok} = 8,1 / 1 = 8,1$$

$$\text{- KT Galat} = 30,1 / 19 = 1,6$$

$$F \text{ Hitung} = 21,5 / 1,6 = 13,4$$

$$= 8,1 / 1,6 = 5,1$$

Tabel Anova

Sumber keragaman	DB	JK	KT	F _{Hitung}	F _{Tabel}	
					5%	1%
Perlakuan	3	64,6	21,5	13,4**	3,13	5,01
Kelompok	1	8,1	8,1	5,1	4,38	8,18
Galat	19	30,1	1,6			
Total	23	94,7				

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata

$$KK = \frac{\sqrt{KTG}}{\gamma} \times 100\%$$

$$= \frac{\sqrt{1,6}}{11,5} \times 100\%$$

$$= \frac{1,3}{11,5} \times 100\%$$

$$= 11,30\%$$



Uji Duncan

$$JNTD\alpha = P\alpha(p.v)S\gamma$$

$$S\gamma = \sqrt{\frac{KTG}{replikasi}}$$

$$= \sqrt{\frac{1,6}{3}} = \sqrt{0,5} = 0,7$$

Tabel Uji Duncan

Perlakuan	Rata-Rata	Beda Jarak dengan		
		12 jam	24 jam	36 jam
12 jam	10,8	-	-	-
24 jam	10,3	4,0 ^{SS}	-	-
36 jam	10,5	3,8 ^S	0,2 ^{NS}	-
48 jam	14,3	3,5 ^S	0,5 ^{NS}	0,3 ^{NS}
$P_{(0,05)} (19)$		2,96	3,11	3,19
$BJND_{0,05}$	$(P.S\gamma)$	2,1016	2,2081	2,2649

Keterangan :

SS = Sangat Signifikan

S = Signifikan

NS = Non Signifikan