BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi Bakteri dalam Rusip dengan metode *Streak Plate*

Isolasi bakteri berguna untuk memisahkan bakteri dari lingkungannya dan untuk mempelajari sifat biakan dan morfologi. Teknik isolasi bakteri antara lain teknik penggoresan agar (*streak plate*), teknik agar tuang (*pour plate*) dan teknik agar sebar (*spread plate)* (Lay 1994). Metode yang dipakai pada penelitian ini adalah metode *streak plate* atau teknik penggoresan agar. Dasar metode *streak plate* adalah menggoreskan suspensi bahan yang mengandung bakteri pada permukaan medium agar yang sesuai dalam cawan petri. Setelah diinkubasi maka pada bekas goresan akan ditumbuhi koloni-koloni terpisah yang mungkin berasal dari satu sel bakteri sehingga dapat diisolasi lebih lanjut (Jutono *et al.* 1980). Hasil isolasi yang telah diperoleh digunakan untuk tahap penelitian berikutnya.

Media yang digunakan untuk isolasi BAL dalam produk Rusip adalah media MRSA (*de Man Rogosa Sharpe Agar*). Penelitian ini menggunakan media MRSA karena media tersebut merupakan media selektif untuk BAL. Media selektif digunakan untuk menumbuhkan dan memelihara bakteri tertentu sehingga dapat menyeleksi BAL dengan sifat khususnya. Media selektif hanya dapat ditumbuhi oleh bakteri tertentu. Oleh karena itu BAL produk Rusip dapat tumbuh, diisolasi dan menghasilkan senyawa sebagai hasil fermentasi dengan menggunakan media MRSA. Komposisi media MRSA dapat dilihat pada lampiran 1.

B. Identifikasi Isolat Bakteri dari produk Rusip

Identifikasi mikroba digunakan untuk menentukan ciri-ciri bakteri yang terdapat dalam produk rusip. Identifikasi dilakukan dengan: (1) pengamatan morfologi; (2) pewarnaan Gram; (3) pengecatan *acid fast* dan (4) uji katalase.

1. Identifikasi Makroskopis Bakteri dalam Produk Rusip

Identifikasi morfologi sel dilakukan untuk mengetahui ukuran, bentuk, rangkaian sel, sifat Gram dan sifat tahan asam (*acid fast*) sehingga dapat mengetahui struktur selnya. Setelah terbentuk koloni pada permukaan agar, maka

dilakukan pengamatan pada pertumbuhan, bentuk, permukaan, elevasi, bentuk tepi koloni (Jutono *et al.* 1980). Koloni mikroba dari produk rusip tumbuh di sepanjang goresan pada permukaan agar setelah diinkubasi 24 jam. Koloni hasil *streak plate* berbentuk *circular* (bulat), permukaan licin, elevasinya *convex* (cembung), bentuk tepinya *entire* (rata) dan berwarna putih. Gambar hasil :

Gambar 1. Hasil identifikasi makroskopis bakteri dalam produk rusip

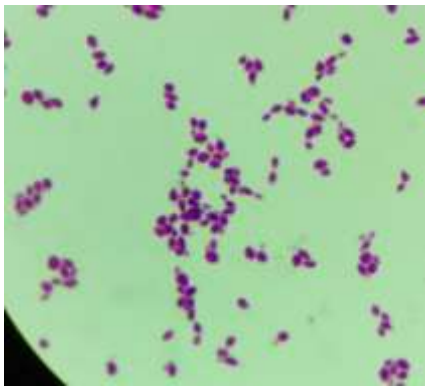
2. Pengecatan Gram bakteri dalam Produk Rusip

Pengecatan Gram digunakan untuk membedakan bakteri yang bersifat Gram positif dan Gram negatif. Pengecatan Gram ini dilakukan melalui 4 tahapan yaitu pemberian cat utama (larutan *crystal violet*), pengintensifan cat utama dengan menambahkan larutan mordan, pencucian dengan larutan peluntur (alkohol), dan pemberian cat penutup (cat lawan) larutan safranin.

Sifat Gram terutama ditentukan oleh sifat fisika dan kimia dinding sel dan membran sitoplasmanya. Dinding sel bakteri Gram positif mempunyai afinitas terhadap kristal violet, sedangkan bakteri Gram negatif afinitasnya sangat kecil (Jutono *et al.* 1980). Hal ini disebabkan adanya perbedaan struktur dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif. Sebagian besar dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari peptidoglikan sedangkan dinding sel bakteri Gram negatif mempunyai kandungan lipid yang tinggi dibandingkan dinding sel bakteri Gram positif. Bakteri Gram positif memiliki membran tunggal yang dilapisi peptidoglikan yang tebal (25-50 nm), sedangkan bakteri Gram negatif lapisam

peptidoglikannya tipis (1-3 nm) (Volk dan Wheller 1988). Lipid ini akan larut dalam alkohol dan aseton yang digunakan sebagai larutan pemucat, sehingga pori-pori dinding sel membesar dan meningkatkan daya larut kompleks kristal violet yodium pada dinding sel bakteri Gram negatif. Pada bakteri Gram positif akan terbentuk kompleks kristal violet yodium yang tidak larut dalam larutan pemucat, kompleks ini tidak terbentuk pada bakteri Gram negatif (Lay 1994).

Pengamatan mikroskopik, menunjukkan bakteri Gram positif tampak berwarna biru atau ungu, sedangkan pada bakteri Gram negatif sel-sel bakteri Gram negatif tampak berwarna merah (Jutono et al 1980). Hasil pengecatan Gram, bakteri yang terdapat dalam produk Rusip bersifat Gram positif. Hal ini dapat dilihat dengan terbentuknya warna biru keunguan pada sel bakterinya. Bakteri Gram positif memiliki afinitas terhadap kristal violet pada dinding selnya sehingga bakteri tidak dapat didekolorisasi dengan alkohol dan tidak dapat diwarnai oleh safranin. Hasil gambar :



Gambar 2. Hasil pengecatan Gram bakteri dalam produk rusip

3. Pengecatan *acid fast* pada bakteri asam laktat (BAL)

Pengecatan *acid fast* bertujuan untuk membedakan bakteri-bakteri yang *acid fast* (tahan terhadap pencucian asam) dan yang non *acid fast* (tidak tahan terhadap pencucian asam). *Fuchsin* yang berwarna merah lebih mudah larut dalam fenol daripada dalam air atau alkohol. Bakteri *acid fast* yang banyak mengandung lemak dan lilin dalam keadaaan panas sangat mudah menyerap *basic* fuchsin yang larut dalam fenol. Pada pencucian, *basic fuchsin* dan fenol sangat tahan terhadap zat pencuci (Jutono et al 1980). Bakteri tahan asam (acid fast) dapat mempertahankan cat warna pertama yaitu *carbol fuchsin* sewaktu dicuci dengan

larutan pemucat yang mengandung asam dan alkohol. Bakteri tahan asam akan terlihat merah. Sebaliknya pada bakteri yang non *acid fast*, larutan pemucat akan melarutkan cat warna pertama sehingga bakteri tidak berwarna. Setelah penambahan cat warna kedua yaitu 38 *metylen blue*, bakteri yang tidak tahan asam akan berwarna biru (Lay 1994)

Dari hasil yang diperoleh bakteri yang terkandung dalam produk Rusip berwarna biru sehingga bakteri tersebut merupakan bakteri tidak tahan asam. Bakteri tidak tahan asam tidak mempunyai lemak dan lilin pada dinding selnya sehingga tidak mudah menyerap *carbol fuchsin*. Cat warna *carbol fuchsin* akan dilarutkan oleh larutan pemucat (alkohol) sehingga sel bakteri menjadi tidak berwarna. Warna biru terbentuk saat penambahan *metylen blue*, sehingga sel bakteri yang tidak berwarna menjadi terwarnai oleh cat biru dari *methylen blue*. Hasil gambar dapat dilihat pada lampiran 4.

4. Uji Katalase

Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri mempunyai enzim katalase atau tidak. Enzim katalase dapat mereduksi H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2. Uji katalase dilakukan dengan menambahkan 1 tetes H_2O_2 pada tabung reaksi yang berisi medium NB yang telah diinokulasi dengan bakteri. Uji ini akan bersifat positif bila terbentuk gelembung gas O_2 pada medium yang mengandung bakteri tersebut setelah didiamkan beberapa detik (Jutono *et al*. 1980). Berdasarkan hasil uji katalase terhadap bakteri pada produk Rusip, bakteri tidak membentuk gelembung gas. Hal ini menandakan bahwa uji katalase bakteri bersifat negatif yang berarti bakteri tidak menghasilkan enzim katalase. Hasil dapat dilihat pada lampiran 4.

C. Hasil Identifikasi Bakteri Uji *E. coli* ATCC 25922 pada Media Selektif

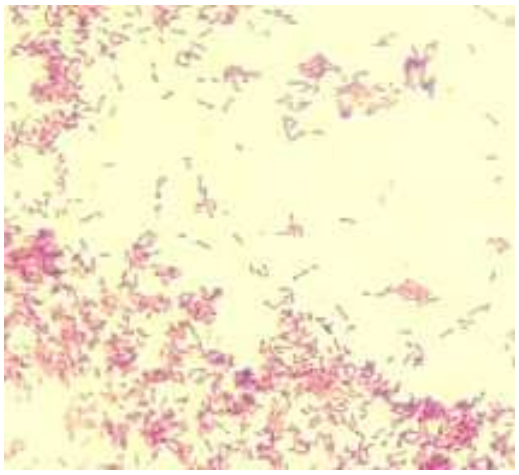
Identifikasi mikroskopis *E. coli* ATCC 25922 dilakukan pada media *Endo Agar* (EA). Hasil positif koloni yang tumbuh berwarna merah dengan logam kilauan permanen dan warna medium merah violet (Volk dan Wheller 1988). Hasil yang didapatkan menunjukkan koloni bakteri *E. coli* ATCC 25922 berwarna

merah dengan logam mengkilap pada media *Endo Agar* (EA). Gambar hasil identifikasi mikroskopis dapat di lihat dalam lampiran 5.

1. Hasil Identifikasi Mikroskopis *E. coli* ATCC 25922 dengan Pewarnaan Gram

Sifat Gram terutama ditentukan oleh sifat fisika dan kimia dinding sel dan membran sitoplasmanya. Dinding sel bakteri Gram positif mempunyai afinitas terhadap kristal violet, sedangkan bakteri Gram negatif afinitasnya sangat kecil (Jutono *et al.* 1980). Hal ini disebabkan adanya perbedaan struktur dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif. Sebagian besar dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari peptidoglikan sedangkan dinding sel bakteri Gram negatif mempunyai kandungan lipid yang tinggi dibandingkan dinding sel bakteri Gram positif. Bakteri Gram positif memiliki membran tunggal yang dilapisi peptidoglikan yang tebal (25-50 nm), sedangkan bakteri Gram negatif lapisam peptidoglikannya tipis (1-3 nm) (Volk dan Wheller 1988). Lipid ini akan larut dalam alkohol dan aseton yang digunakan sebagai larutan pemucat, sehingga pori-pori dinding sel membesar dan meningkatkan daya larut kompleks kristal violet yodium pada dinding sel bakteri Gram negatif. Pada bakteri Gram positif akan terbentuk kompleks kristal violet yodium yang tidak larut dalam larutan pemucat, kompleks ini tidak terbentuk pada bakteri Gram negatif (Lay 1994).

Pengamatan mikroskopik, menunjukkan bakteri Gram positif tampak berwarna biru atau ungu, sedangkan pada bakteri Gram negatif sel-sel bakteri Gram negatif tampak berwarna merah (Jutono et al 1980). Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa bakteri *E. coli* ATCC 25922 termasuk kedalam bakteri Gram negatif dilihat dari sel yang berwarna merah. Gambar hasil identifikasi secara mikroskopis :



Gambar 3. Hasil identifikasi mikroskopis *E. coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan Gram

2. Hasil Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 Berdasarkan Uji Biokimia

Tabel 1. Hasil identifikasi Escherichia coli ATCC 25922 Berdasarkan Uji Biokimia

Pengujian	Hasil	Pustaka
SIM	-++	-++
KIA	A/AG S(-)	A/AG S(-)
LIA	K/K S(-)	K/K S(-)
SCA	-	-

Keterangan :

SIM	: Sulfida Indol Mortility	A	: Kuning
KIA	: Kligers Iron Agar	K	: Merah atau Ungu
LIA	: Lysin Iron Agar	S	: Hitam
+	: Reaksi positif	G	: Gas
-	: Reaksi negatif		

Hasil pengujian pada medium SIM menunjukkan (-++) yaitu *E. coli* ATCC 25922 tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan *hydrogen sulfida* sehingga menghasilkan media tidak berwarna hitam. Penambahan tiga tetes *Erlich* A dan B pada permukaan media berwarna merah muda. Hal ini berarti uji indol positif, artinya *E. coli* ATCC 25922 menghasilkan *triptopanase*. Uji motilitas positif ditunjukkan dengan penyebaran pertumbuhan di media SIM.

Uji pada medium KIA untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas, dan pembentukan sulfida. Hasil yang diperoleh yaitu A/AGS(-), A/A artinya pada lereng dan dasar media berwarna kuning, hal ini menunjukkan bahwa bakteri *E. coli* mampu memfermentasi glukosa dan laktosa. Medium KIA mengandung laktosa 1% dan glukosa 0,1%, dan phenol red

sebagai indikator. Perubahan warna media menjadi kuning disebabkan oleh aktivitas fermentasi bakteri yang mengubah pH media menjadi asam dimana indikator pada media adalah *phenol red* (dalam suasana asam). Medium KIA juga 40 mengandung *sodium thiosulfat* yaitu suatu substrat penghasil H_2S. G artinya terdapat gas sehingga menyebabkan media terangkat, S(-) artinya uji hidrogen sulfida negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media KIA, endapan hitam ini terbentuk dari hidrogen sulfida yang akan bereaksi dengan Fe++. Hidrogen sulfida terbentuk karena bakteri mampu mendesulfurasi asam amino dan methion.

Medium LIA untuk mengetahui deaminasi lisin dan pembentukan sulfida. Pengujian dengan medium LIA menunjukkan hasil K/KS(-), K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak dekarboksilasi lisin tetapi mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) di seluruh media, S(-) artinya uji H_2S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA.

Media SCA untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian SCA menunjukkan hasil negatif, hal ini menunjukkan bahwa *E. coli* tidak menggunakan SCA sebagai sumber karbon tunggal. Medium SCA mengandung trinatrium sitrat sebagai sumber karbon, bila trinatrium sitrat ini dapat diuraikan maka ammonium dihidrogenfosfat turut teruraikan dan akan melepaskan NH_4+ sehingga menyebabkan medium menjadi alkalis, dan indikator BTB (*Bromo Thymol Blue*) mengubah warna medium dari hijau menjadi biru. Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan menunjukkan bahwa bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *E. coli* ATCC 25922. Hasil gambar dapat dilihat pada lampiran 7.

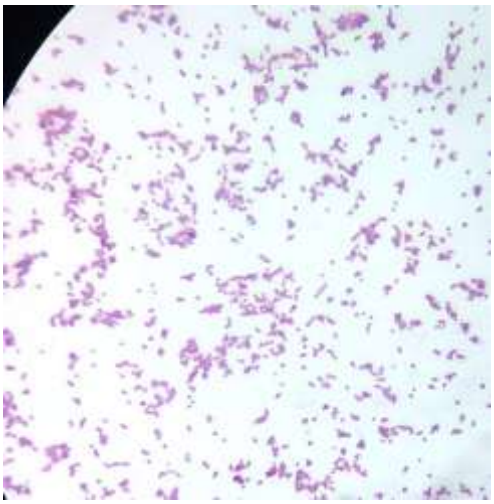
D. Hasil Identifikasi Bakteri *S. aureus* ATCC 25923

Identifikasi mikroskopis *S. aureus* ATCC 25923 dilakukan pada media VJA. Hasil positif bila koloni yang tumbuh berwarna hitam dan medium sekitarnya berwarna kuning, hal ini disebabkan karena bakteri *S. aureus* dapat memfermentasi manitol menjadi asam dan adanya indicator *phenol red*

menyebabkan warna media menjadi kuning, sedangkan warna hitam pada koloni disebabkan karena bakteri *S. aureus* mampu mereduksi kalium tellurit menjadi metalik tellurit (Jawetz *et al.* 2007). Hasil gambar dapat dilihat pada lampiran 8.

1. Hasil Identifikasi Mikroskopis *S. aureus* ATCC 25923 dengan Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri uji termasuk golongan Gram positif. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa bakteri *S. aureus* ATCC 25923 termasuk kedalam bakteri Gram positif dilihat dari sel yang berwarna ungu. Pengamatan mikroskopik menunjukkan bakteri Gram positif tampak berwarna biru atau ungu, sedangkan pada bakteri Gram negatif sel-sel bakteri Gram negatif tampak berwarna merah (Jutono et al 1980). Hasil gambar :



Gambar 4. Hasil identifikasi mikroskopis *S. aureus* ATCC 25923 dengan pewarnaan Gram

2. Hasil Identifikasi Biokimia *S. aureus* ATCC 25923

Identifikasi bakteri *S. aureus* dilakukan dua uji yaitu uji koagulase dan katalase. Uji koagulase dapat dilakukan dengan cara menginokulasikan koloni *S. aureus* kedalam BHI 2 ml lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37ºC. Inokulum tersebut dipindahkan sejumlah 1 ml ke dalam tabung reaksi steril kemudian ditambah 0,5 ml plasma lalu diaduk dan diinkubasi sampai 24 jam. Hal ini dimaksudkan untuk melihat atau mengecek koagulan yang terbentuk. Hasil penelitian menunjukkan positif terjadi koagulasi, yang berarti bahwa bakteri tersebut memang *S. aureus* ATCC 25923.

Sedangkan uji katalase digunakan untuk membedakan *S. aureus* dengan *Streptococcus.* Hasil pengujian dari uji katalase *S. aureus* ATCC 25923 setelah penambahan 2 tetes Hidrogen Peroksida (H_2O_2) 3% adalah positif yaitu ditandai dengan terbentuknya gelembung udara. Gelembung udara dihasilkan karena bakteri *S. aureus* mempunyai enzim katalase sehingga penambahan H_2O_2 akan terurai menjadi H_2O dan O_2. Hasil gambar dapat dilihat pada lampiran 10.

E. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan suspensi bakteri menggunakan media BHI dan distandarkan dengan Mc Farland 0,5. Tujuan penentuan jumlah bakteri dengan Mc. Farland 0,5 yaitu untuk mengetahui kisaran jumlah koloni bakteri yang terdapat pada suspensi bakteri, bila tidak distandarkan dengan Mc. Farland 0,5 dimungkinkan bakteri terlalu banyak atau terlalu sedikit sehingga mempengaruhi hasil penelitian. Hasil gambar dapat dilihat pada lampiran 11.

F. Pembuatan Supernatan BAL Produk Rusip

Pada penelitian kali ini digunakan supernatan dari hasil isolasi BAL produk Rusip. Hal tersebut didasarkan pada penelitian sebelumnya oleh Desniar *et al.* (2011) bahwa BAL pada produk fermentasi Rusip merupakan bakteri ekstraseluler. Bakteri ekstraseluler mengekpresikan senyawa antibakteri pada media, sehingga suspensi BAL dapat langsung disentrifugasi dan menghasilkan supernatan yang mengandung seyawa antibakteri. Hasil supernatan dapat dilihat pada lampiran 12.

G. Uji Potensi Antibakteri dari Supernatan BAL Produk Rusip dengan Metode Difusi

Pengujian aktivitas antibakteri metode difusi kali ini dipilih dengan teknik sumuran, metode sumuran umum digunakan dalam uji aktivitas antibakteri karena lebih efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri dan zat aktif dapat berdifusi langsung tanpa penghalang kertas cakram (Djide dan Sartini 2008). Metode difusi dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan konsentrasi paling efektif dari supernatan produk Rusip yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji. Kontrol positif menggunakan antibiotik khloramfenikol sedangkan kontrol negatif

menggunakan aquades steril. Pengujian difusi sumuran dilakukan sebanyak 3 kali pada masing-masing seri konsentrasinya. Hasil pengujian difusi sumuran dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengujian aktivitas antibakteri supernatan BAL produk Rusip terhadap *E. coli* ATCC 25922 dan S. aureus ATCC 25923 dengan metode difusi sumuran

No.	Konsentrasi (ppm)	Diameter hambat (mm) *E. coli* ATCC 25922 Replikasi			Rata-rata ± SD	Diameter hambat (mm) *S. aureus* ATCC 25923 Replikasi			Rata-rata ± SD
		I	II	III		I	II	III	
1.	800	12	13	12	12,33 ± 0,57	10	9	10	9,67 ± 0,57
2.	400	11	10	11	10,67 ± 0,57	8	7	8	7,67 ± 0,57
3.	200	9	9	8	8,67 ± 0,57	7	6	7	6,67 ± 0,57
4.	Kontrol (+)	28	28	29	28,33 ± 0,57	27	28	28	27,67 ± 0,57
5.	Kontrol (-)	0	0	0	0	0	0	0	0

Berdasarkan hasil pada tabel 2 terlihat adanya daya hambat yang terbentuk. Hasil tersebut diperoleh dari pengukuran diameter zona bening di sekitar sumuran yang menandakan bahwa tidak ada bakteri yang tumbuh pada area tersebut. Tabel di atas menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri supernatan produk Rusip mempunyai daya hambat lebih besar terhadap bakteri uji *E. coli* ATCC 25922 dibandingkan dengan bakteri uji *S. aureus* ATCC 25923 pada masing-masing variasi konsentrasi supernatannya. Aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* ATCC 25922 dengan konsentrasi supernatan 800 ppm yaitu 12,33 mm sedangkan pada *S. aureus* ATCC 25923 yaitu 9,67 mm. Aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* ATCC 25922 dengan konsentrasi supernatan 400 ppm yaitu 10,67 mm sedangkan pada *S. aureus* ATCC 25923 yaitu 7,67 mm. Aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* ATCC 25922 dengan konsentrasi supernatan 200 ppm yaitu 8,67 mm sedangkan pada *S. aureus* ATCC 25923 yaitu 6,67 ppm.

Berdasarkan uji difusi, penghambatan lebih besar pada bakteri Gram negatif (*E. coli* ATCC 25922) jika dibandingkan dengan bakteri Gram positif (*S. aureus* ATCC 25923). Menurut Djide dan Sartini (2008), bakteri asam laktat produk Rusip menghasilkan senyawa seperti asam laktat, asam asetat, hidrogen peroksida dan bakteriosin yang berfungsi sebagai antibakteri. Salah satu senyawa dari supernatan produk Rusip yaitu bakteriosin, target kerja dari bakteriosin

adalah dinding sel bakteri. Mekanisme utama bakteriosin yaitu penghambatan biosintesis dinding sel bakteri dan pembentukan pori, karena adanya pori pada dinding sel bakteri maka substansi yang terdapat di dalam sel akan keluar sehingga menimbulkan kerusakan hingga kematian sel (Drider *et al.* 2006). Perbedaan diameter zona hambat pada hasil uji difusi dikarenakan adanya perbedaan sifat dari kedua bakteri uji. Dinding sel Gram negatif lebih tipis yaitu berkisar 10–15 nm sedangkan dinding sel bakteri Gram positif lebih tebal yaitu berkisar 15–23 nm sehingga lebih sulit untuk dirusak (Yulinery 2009). Selain dari bakteriosin aktivitas antimikroba lain dari supernatan produk Rusip yaitu adanya kandungan asam laktat dan asam asetat, asam laktat dan asetat dapat menembus sel mikroba sehingga dapat merubah pH didalam sel bakteri dan mengganggu fungsi metabolik sel (Baird dan Parker 1980).

Aktivitas suatu senyawa antibakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain kandungan senyawa antibakteri, daya difusi, jenis bakteri yang dihambat (Jawetz *et al.* 1986). Konsentrasi jumlah senyawa antibakteri yang semakin tinggi menyebabkan terbentuknya zona hambatan yang semakin besar. Ajizah (2004) menyatakan bahwa semakin besar jumlah konsentrasi suatu senyawa antibakteri, maka senyawa aktif yang terkandung didalam suatu bahan atau sampel tersebut semakin banyak, sehingga memberikan pengaruh terhadap diameter zona hambat yang terbentuk. Menurut Suriwiria (2005), berdasarkan zona hambat yang terbentuk maka aktivitas antimikroba dapat digolongkan menjadi beberapa golongan yaitu lemah (zona hambat <5 mm), sedang (zona hambat antara 5-10 mm), kuat (zona hambat 10-20 mm), dan tergolong sangat kuat (zona hambat >20mm).

Zona hambat yang didapatkan dari aktivitas antibakteri supernatan produk Rusip dengan metode difusi sumuran yaitu pada konsentrasi 200 ppm terhadap *E. coli* ATCC 25922 sebesar 8,67 ± 0,57 mm diameter tersebut tergolong sedang, sedangkan terhadap *S. aureus* ATCC 25923 sebesar 6,67 ± 0,57 mm dengan diameter tersebut juga tergolong sedang. Pada konsentrasi 400 ppm terhadap *E. coli* ATCC 25922 sebesar 10,67 ± 0,57 mm diameter tersebut tergolong kuat, sedangkan terhadap *S. aureus* ATCC 25923 sebesar 7,67 ± 0,57 mm dengan

diameter tersebut tergolong sedang. Pada konsentrasi 800 ppm terhadap *E. coli* ATCC 25922 sebesar 12,33 ± 0,57 mm diameter tersebut tergolong kuat, sedangkan terhadap *S. aureus* ATCC 25923 sebesar 9,67 ± 0,57 mm dengan diameter tersebut masih tergolong sedang. Aquades steril digunakan sebagai kontrol negatif, sehingga pelarut tersebut tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri artinya, aquadest tersebut tidak memiliki zona hambat pada media tersebut. Khloramfenikol sebagai kontrol positif memiliki diameter zona hambat yang paling besar dibandingkan dengan supernatan yang dihasilkan dari produk Rusip. Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada lampiran 13.

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan SPSS, hasil uji *Kolmogorof-Smirnov* antara bakteri uji diperoleh signifikansi > 0.05 maka dapat disimpulkan data tersebut terdistribusi normal. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Tukey*, hasil yang diperoleh menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hasil gambar dapat dilihat pada lampiran 15.

H. Uji Potensi Antibakteri dari Supernatan BAL Produk Rusip dengan Metode Dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri pada metode dilusi yaitu dengan menggunakan seri konsentrasi pengenceran bertingkat. Seri konsentrasi yang dibuat untuk pengujian supernatan produk Rusip adalah 800 ppm; 400 ppm; 200 ppm; 100 ppm; 50 ppm; 25 ppm dan 12,5 ppm dengan kontrol positif berupa suspensi bakteri dan kontrol negatif berupa supernatan produk Rusip. Pengujian aktivitas secara dilusi bertujuan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) supernatan BAL produk Rusip terhadap bakteri uji.

KHM dilihat dari kejernihan tabung yang menunjukkan bahwa pada tabung dengan konsentrasi tertentu dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji. Konsentrasi terendah dari tabung yang menunjukkan kejernihan ditentukan sebagai KHM. KBM menunjukkan adanya daya bunuh bakteri dari supernatan BAL produk Rusip terhadap bakteri uji. KBM dapat ditentukan dari penginokulasian tabung yang jernih pada media VJA untuk bakteri uji *S. aureus* ATCC 25923 dan EA untuk bakteri uji *E. coli* ATCC 25922. Penanaman pada

media-media tersebut bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya bakteri yang tumbuh. Konsentrasi terendah dari supernatan BAL produk Rusip yang tidak ditumbuhi bakteri, menunjukkan KBM terhadap bakteri uji. Hasil uji aktivitas antibakteri secara dilusi dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengujian aktivitas antibakteri supernatan BAL produk Rusip terhadap *E. coli* ATCC 25922 dan *S. aureus* ATCC 25923 dengan metode dilusi

No.	Konsentrasi (ppm)	Kekeruhan					
		E. coli ATCC 25922			*S. aureus* ATCC 25923		
		Replikasi			Replikasi		
		I	II	III	I	II	III
1.	Kontrol (-)	-	-	-	-	-	-
3.	800	-	-	-	-	-	-
4.	400	-	-	-	-	-	-
5.	200	-	-	-	-	-	-
6.	100	+	+	+	+	+	+
7.	50	+	+	+	+	+	+
8.	25	+	+	+	+	+	+
9.	12.5	+	+	+	+	+	+
10.	Kontrol (+)	+	+	+	+	+	+

Keterangan :
(+) : Keruh
(-) : Jernih

Berdasarkan tabel diatas, dapat dilihat bahwa pengujian dilakukan 3 kali pengulangan. KBM dalam penelitian ini dapat diketahui dengan melihat ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri setelah tabung yang jernih digoreskan pada media VJA untuk bakteri uji *S. aureus* ATCC 25923 dan EA untuk bakteri uji *E. coli* ATCC 25922. Hasil positif *S. aureus* ATCC 25923 yang tampak pada media VJA adalah terlihat adanya koloni yang bercirikan berwarna hitam dengan media di sekitarnya berwarna kuning. Hasil positif *E. coli* ATCC 25922 yang tampak pada media EA adalah koloni merah dengan kilat logam yang permanen dan warna media merah violet. Hasil penggoresan pada media VJA dan EA dapat dilihat di tabel 4.

Tabel 4. Penggoresan hasil dilusi pada media selektif.

No.	Konsentrasi (ppm)	*Endo Agar* (*E. coli* ATCC 25922) Replikasi			*Vogel Johnson Agar* (*S. aureus* ATCC 25923) Replikasi		
		I	II	III	I	II	III
1.	Kontrol (-)	-	-	-	-	-	-
2.	800	-	-	-	-	-	-
3.	400	-	-	-	+	+	+
4.	200	+	+	+	+	+	+
5.	Kontrol (+)	+	+	+	+	+	+

Keterangan
(-) : tidak ada pertumbuhan bakteri
(+) : ada pertumbuhan bakteri

Hasil penelitian menunjukkan bahwa KHM supernatan BAL produk Rusip terhadap bakteri uji *S. aureus* ATCC 25923 dan *E. coli* ATCC 25922 adalah sama yaitu 200 ppm. KBM supernatan produk Rusip terhadap bakteri uji *S. aureus* ATCC 25923 adalah 800 ppm, sedangkan terhadap bakteri uji *E. coli* ATCC 25922 adalah 400 ppm. Hasil penentuan KHM dan KBM menunjukkan bahwa supernatan BAL produk Rusip mempunyai efek bakteriostatik dan bakterisidal terhadap bakteri uji. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Batubara (2018), bahwa senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh BAL dapat digunakan sebagai antibiotik alami pengganti antibiotik sintesis. Penggunaan antibiotik alami juga dapat mengurangi terjadinya resistensi mikroba terhadap bakteri patogen karena konsumsi antibiotik sintesis secara terus-menerus.

BAB V
PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, di dalam produk Rusip terdapat BAL.

Kedua, supernatan BAL produk Rusip memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Ketiga, konsentrasi paling aktif dari supernatan BAL produk rusip yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah 800 ppm.

Konsentrasi hambat minimum (KHM) dari supernatan BAL produk Rusip terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah 200 ppm. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari supernatan BAL produk Rusip terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah 400 ppm, sedangakan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah 800 ppm.

B. Saran

Dalam penelitian ini masih banyak kekurangan, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai:

Pertama, perlu dilakukan penelitain lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas antibakteri supernatan BAL produk Rusip terhadap mikroorganisme lainnya.

Kedua, perlu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan yang lebih tinggi agar diperoleh supernatan yang lebih murni.

Ketiga, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada tahap formulasi supernatan agar dapat digunakan masyarakat.