

**UJI POTENSI ANTIBAKTERI YANG DIHASILKAN BAKTERI ASAM  
LAKTAT DARI PRODUK SUSU TERHADAP BAKTERI  
*Escherichia coli* ATCC 25922**



**Oleh:**

**Jemmy Kristian  
20144077A**

**Kepada  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

**UJI POTENSI ANTIBAKTERI YANG DIHASILKAN BAKTERI ASAM  
LAKTAT DARI PRODUK SUSU TERHADAP BAKTERI  
*Escherichia coli* ATCC 25922**



**Oleh:**

**Jemmy Kristian  
20144077A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

## PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul :

### UJI POTENSI ANTIBAKTERI YANG DIHASILKAN BAKTERI ASAM LAKTAT DARI PRODUK SUSU TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* ATCC 25922

Oleh :

Jemmy Kristian  
20144077A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi  
Pada tanggal 28 Juni 2018

Mengetahui,  
Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi

Dekan,



Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt

Pembimbing Utama,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ana Indrayati".

Dr. Ana Indrayati, M. Si

Pembimbing Pendamping,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Destik Wulandari".

Destik Wulandari, S.Pd., M. Si

Penguji :

1. Drs. Edy Prasetya, M. Si
2. Dra. Nony Puspawati, M. Si
3. Drs. Mardiyono, M. Si
4. Dr. Ana Indrayati, M. Si

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Edy Prasetya".

1. ....

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Nony Puspawati".

2. ....

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Mardiyono".

3. ....

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ana Indrayati".

4. ....

## PERSEMBAHAN

*Janganlah hendaknya kamu kuatir tentang apapun juga, tetapi nyatakanlah dalam segala hal keinginanmu kepada Allah dalam doa dan permohonan dengan ucapan syukur.*

*Damai sejahtera Allah yang melampaui segala akal, akan memelihara hati dan pikiranmu dalam Kristus Yesus.*

*Filipi 4:6-7*

*Sebab Aku ini mengetahui rancangan-rancangan apa yang ada pada-Ku mengenai kamu, demikianlah firman Tuhan, yaitu rancangan damai sejahtera dan bukan rancangan kecelakaan, untuk memberikan kepadamu hari depan yang penuh harapan.*

*Yeremia 29:11*

*Bersukacitalah senantiasa.*

*Tetaplah berdoa.*

*Mengucap syukurlah dalam segala hal, sebab itulah yang dikehendaki Allah di dalam Kristus Yesus bagimu.*

*1 Tesalonika 5:16-18*

Persembahan syukurku untuk :  
Tuhan Yesus Kristus

Bapak dan ibu yang selalu memberi semangat dan cinta kasih  
Seluruh keluarga dan sahabat  
Teman-teman seperjuangan

## **PERNYATAAN**

Saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, Juni 2018



Jemmy Kristian

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus atas berkat dan kasihNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "**UJI POTENSI ANTIBAKTERI YANG DIHASILKAN BAKTERI ASAM LAKTAT DARI PRODUK SUSU TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* ATCC 25922**". Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh derajat sarjana di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan dan penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, dukungan, dan bimbingan dari berbagai pihak sehingga penulis menyampaikan terimakasih kepada yang terhormat :

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA selaku rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt, selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Dr. Ana Indrayati, M.Si selaku pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, arahan, nasehat, dan ilmunya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Destik Wulandari, S.Pd.,M.Si selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Tim penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan kritik dan saran sehingga skripsi ini menjadi lebih baik.
6. Bapak, ibu, adik, Agtsel Winda Charistie, teman-teman angkatan MUDA 2014 PMK Katharos dan semua keluarga terima kasih untuk doa, dukungan dan semangat yang diberikan.
7. Para sahabat khususnya Marwan, Udin, Sopan, Deni, Nyoman, Lisa, Sukron, Hadrah, Rasyid, Ezra, Melly, Antoni, Agape, Mario dan teman-teman yang lain terima kasih banyak atas bantuan dan supportnya selama ini untuk supaya skripsi ini selesai.

8. Segenap dosen, staff, laboran, dan asisten laboratorium, perpustakaan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah memberikan bantuan selama penelitian.
9. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dari pihak terkait maka skripsi ini tidak selesai dengan baik. Penulis juga menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis sangat berharap kritik dan saran. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi seluruh masyarakat dan perkembangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang farmasi.

Surakarta, Mei 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL .....	i
PENGESAHAN SKRIPSI .....	ii
PERSEMAHAN.....	iii
PERNYATAAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
INTISARI.....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
BAB I PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	3
C. Tujuan Penelitian .....	3
D. Kegunaan Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Susu Fermentasi .....	5
1. Kelembaban .....	7
2. Kadar Keasaman .....	7
3. Nutrien.....	8
4. Temperatur Penyimpanan.....	8
5. Atmosfer .....	8
B. Yoghurt.....	8
1. Homogenisasi .....	9
2. Pasteurisasi .....	9
3. Pendinginan .....	9
4. Inokulasi .....	9
5. Inkubasi (fermentasi) .....	9
C. Bakteri Asam Laktat (BAL).....	10
D. Media.....	11
1. Macam-macam bentuk media.....	12
1.1 Media padat.....	12

1.2 Media setengah padat .....	12
1.3 Media cair .....	12
2. Klasifikasi media .....	12
2.2 Media kompleks .....	13
2.3 Media anaerob .....	13
2.4 Media biakan khusus .....	13
2.5 Media selektif dan diferensial. ....	13
2.6 Media pengayaan.....	13
E. Sterilisasi .....	14
F. Diare .....	15
G. Escherichia coli .....	15
1. Sistematika bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	15
2. Morfologi dan Identifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	16
3. Sifat bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	17
4. Fisiologi <i>Escherichia coli</i> .....	17
5. Toksin <i>Escherichia coli</i> .....	17
6. Patogenesis <i>Escherichia coli</i> .....	18
H. Antibakteri.....	18
1. Pengertian Antibakteri .....	18
2. Mekanisme kerja antibakteri .....	19
2.1 Penghambatan metabolisme sel bakteri.....	19
2.2 Penghambatan sintesis dinding sel. ....	19
2.3 Perubahan permeabilitas membran sel bakteri.....	19
2.4 Penghambatan sintesis protein sel bakteri .....	20
2.5 Penghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri .....	20
I. Metode Pengujian Antibakteri.....	20
1. Metode Difusi .....	20
J. Amoksisilin.....	21
K. Landasan Teori.....	21
L. Hipotesis .....	24
 BAB III METODE PENELITIAN.....	25
A. Populasi dan Sampel .....	25
1. Populasi .....	25
2. Sampel.....	25
B. Variabel Penelitian .....	25
1. Identifikasi variabel utama .....	25
2. Klasifikasi variabel utama .....	25
3. Definisi operasional variabel utama.....	26
C. Alat dan Bahan.....	27
1. Alat.....	27
2. Bahan.....	27
D. Jalannya Penelitian.....	27
1. Sterilisasi alat.....	27
2. Isolasi Bakteri dalam susu fermentasi merek “X” dan “Y” ....	28

3.	Identifikasi Bakteri dari dalam susu fermentasi merek “X” dan “Y” .....	28
3.1	Pengamatan Morfologi Koloni.....	28
3.2	Pewarnaan Gram .....	28
3.3	Pengecatan <i>acid fast</i> .....	28
3.4	Uji Katalase .....	29
4.	Identifikasi makroskopis <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 pada medium diferensial .....	29
5.	Identifikasi mikroskopis <i>Escherichia coli</i> dengan pewarnaan Gram.....	29
6.	Identifikasi <i>Escherichia coli</i> dengan uji biokimia .....	30
7.	Pembuatan suspensi bakteri uji.....	31
8.	Pengujian Potensi Antibakteri dari Produk Susu Fermentasi merek “X” dan “Y” .....	31
8.1	Pengujian daya hambat menggunakan Kertas Cakram ....	31
8.2	Pengujian daya hambat antibakteri dengan Sumuran.....	31
E.	Analisis Data.....	32
F.	Skema Jalannya Penelitian .....	33
<b>BAB IV</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>35</b>
A.	Isolasi Bakteri dalam Susu Fermentasi merek X dan Y dengan Metode Streak Plate .....	35
B.	Identifikasi Isolat Bakteri dari Susu Fermentasi merek X dan Y.....	36
1.	Identifikasi Makroskopis Bakteri dalam Susu Fermentasi Merek X dan Y .....	36
2.	Pengecatan Gram bakteri dalam susu fermentasi merek X dan Y .....	36
3.	Pengecatan <i>acid fast</i> pada bakteri asam laktat (BAL) .....	37
4.	Uji katalase .....	38
C.	Hasil Identifikasi Bakteri Uji <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 pada Media Selektif.....	38
D.	Hasil Identifikasi Mikroskopis <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 dengan Pewarnaan Gram.....	39
E.	Hasil Identifikasi <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 Berdasarkan Uji Biokimia .....	39
F.	Pembuatan Suspensi Bakteri Uji.....	40
G.	Uji Potensi Antibakteri dari Susu Fermentasi Merek X dan Y .....	41
<b>BAB V</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>46</b>
A.	Kesimpulan.....	46
B.	Saran.....	46
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>47</b>	
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>54</b>	

## **DAFTAR GAMBAR**

Halaman

Gambar 1. Skema jalannya penelitian ..... 34

## **DAFTAR TABEL**

Halaman

Tabel 1. Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Isolat Bakteri dalam Susu Fermentasi merek X dan Y .....	36
Tabel 2. Hasil identifikasi <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 berdasarkan uji biokimia.....	39
Tabel 3. Hasil pengujian aktivitas antibakteri susu fermentasi merek X dan Y terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 dengan menggunakan kertas cakram.....	41
Tabel 4. Hasil pengujian aktivitas antibakteri susu fermentasi merek X dan Y terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 dengan menggunakan sumuran .....	41

## **DAFTAR LAMPIRAN**

Halaman

Lampiran 1.	Daftar Komposisi Media MRS (Man Rogosa Sharpe) Agar .....	55
Lampiran 2.	Hasil Morfologi Koloni Isolat Bakteri dari Susu Fermentasi merek X dan Y dalam media MRSA .....	56
Lampiran 3.	Gambar hasil identifikasi mikroskopis BAL dalam susu fermentasi merek X dan Y dengan pewarnaan gram .....	57
Lampiran 4.	Gambar hasil mikroskopis dengan pewarnaan <i>acid fast</i> dan uji katalasae pada bakteri BAL .....	58
Lampiran 5.	Gambar hasil identifikasi makroskopis bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 pada media <i>Endo Agar</i> (EA) .....	59
Lampiran 6.	Gambar hasil identifikasi mikroskopis bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 dengan pewarnaan gram .....	60
Lampiran 7.	Hasil Uji Biokimia .....	61
Lampiran 8.	Pembuatan suspensi bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 pada media BHI .....	63
Lampiran 9.	Foto hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi.....	64
Lampiran 10.	Sampel susu fermentasi .....	66
Lampiran 11.	Foto alat .....	67
Lampiran 12.	Hasil analisis statistik .....	69
Lampiran 13.	Komposisi dan pembuatan media .....	75

## INTISARI

**KRISTIAN, J., 2018, UJI POTENSI ANTIBAKTERI YANG DIHASILKAN BAKTERI ASAM LAKTAT DARI PRODUK SUSU TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* ATCC 25922. SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA**

Susu fermentasi merupakan susu yang dihasilkan dari proses fermentasi beberapa jenis bakteri, terutama bakteri asam laktat (BAL). Hasil dari fermentasi tersebut sebagian besar adalah senyawa asam laktat yang mempunyai potensi menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi antibakteri senyawa bakteriosin dan asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL) dalam susu fermentasi merek X dan Y terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu isolasi bakteri dalam susu fermentasi merek X dan Y dengan metode *streak plate* pada media MRSA; isolasi senyawa yang dihasilkan bakteri dalam susu fermentasi merek X dan Y; pengujian potensi senyawa yang dihasilkan bakteri asam laktat (BAL) dalam susu fermentasi merek X dan Y dengan metode difusi menggunakan kertas cakram dan sumuran dengan perlakuan inkubasi selama 24 jam dan 48 jam. Analisa data menggunakan metode ANOVA.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa yang dihasilkan isolat bakteri asam laktat (BAL) dalam susu fermentasi merek X dan Y mempunyai potensi antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, dengan senyawa yang lebih aktif terdapat pada susu fermentasi merek X dengan zona hambat yang terbentuk sebesar 11,6 mm.

---

Kata kunci : Susu fermentasi, BAL, antibakteri, difusi

## **ABSTRACT**

**KRISTIAN, J., 2018, TEST OF ANTIBACTERY POTENTIALS THAT BASED ON ACID BACTERIA FROM MILK PRODUCTS TO BACTERIA *Escherichia coli* ATCC 25922, THESIS, FACULTY OF PHARMACY, UNIVERSITY OF SETIA BUDI, SURAKARTA**

Fermented milk is produced from the fermentation process of several types of bacteria, especially lactic acid bacteria (BAL). Fermentation products are mostly lactic acid compounds that have the potential to inhibit the growth of pathogenic bacteria.

This study aims to test the antibacterial potency of bacteriocin and lactic acid produced by lactic acid bacteria (BAL) in branded X and Y fermented milk against bacterium *Escherichia coli* ATCC 25922. This research was conducted in several stages: bacterial isolation in brand X fermented milk and Y with streak plate method on MRSA media; isolation of bacterial-generated compounds in brand X and Y fermented milk; testing of potential compounds produced by lactic acid bacteria (BAL) in brand X and Y fermentation milk by diffusion method using paper discs and wells with incubation treatment for 24 hours and 48 hours. Data analysis using ANOVA method..

The results showed that the compound produced by lactic acid bacteria (BAL) in branded X and Y fermentation milk had antibacterial potency against *Escherichia coli* ATCC 25922, with the most active compound found in brand X fermented milk with inhibit zone formed of 11.6 mm.

---

Keywords: Fermented milk, BAL, antibacterial, diffusion

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Latar Belakang**

Infeksi merupakan salah satu masalah dalam bidang kesehatan yang dari waktu ke waktu terus berkembang dengan pesat. Salah satu penyebab infeksi adalah bakteri (Radji 2011). Hal ini ditunjang dengan keadaan udara di Indonesia yang panas, lembab dan berdebu sehingga mikroba dapat tumbuh dengan subur (Djide dan Sartini 2008).

Penyakit infeksi yang banyak dijumpai di Indonesia salah satunya adalah diare. Diare adalah suatu kondisi ketika konsistensi feses lembek dan cair, bahkan dapat berupa air saja dan frekuensinya lebih sering (biasanya tiga kali atau lebih) dalam satu hari. Diare merupakan salah satu penyebab kematian, karena penderita mengalami dehidrasi. Bakteri penyebab diare meliputi *Shigella*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* (Tjay dan Raharja 2002). *Escherichia coli* merupakan bakteri flora normal pada saluran cerna, yang dapat menyebabkan infeksi atau diare sedang sampai berat pada saluran cerna manusia. Bakteri ini termasuk dalam famili Enterobacteriaceae yang dapat hidup dalam usus besar manusia dan hewan, dalam tanah dan dalam air (Maksum 2002).

Bakteri selain merugikan terdapat pula yang menguntungkan, salah satunya bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri yang tidak bersifat membahayakan dan penggunaannya sudah dilakukan sejak lama oleh manusia. Bakteri asam laktat (BAL) dapat memproduksi substansi antibakteri yang dapat memperpanjang umur simpan dari produk. Seiring berkembangnya zaman konsumen semakin menyadari pentingnya kesehatan, maka lebih tertarik pada makanan yang tidak mengandung bahan pengawet terutama yang berasal dari bahan non pangan. Maka perusahaan makanan harus mempertimbangkan secara hati-hati bahkan harus sekecil mungkin menggunakan bahan tambahan non makanan dan sintetis. Fakta tersebut mendorong orientasi pencarian bahan pengawet adalah yang dapat diterima konsumen dan secara alami ada dalam makanan, misalnya berasal dari tanaman, hewan atau dihasilkan oleh

mikroorganisme yang disebut biopreservatif. Salah satu bahan alami yang telah digunakan dan diuji aman yaitu bakteriosin yang berasal dari BAL (Ray 1992).

Saat ini telah berkembang dengan pesat produk fermentasi susu yang dikaitkan dengan kesehatan yang dikenal sebagai minuman probiotik. Probiotik yang umumnya adalah BAL yang menjanjikan berbagai manfaat bagi kesehatan antara lain mengatur flora usus manusia. Susu fermentasi didefinisikan sebagai produk susu yang melibatkan mikroba untuk menghasilkan flavour, warna, tekstur dan konsistensi yang diinginkan dan mampu mencegah *lactose intolerance*. Produk susu fermentasi yang umum dikonsumsi oleh masyarakat adalah yakult, yoghurt, kefir dan susu fermentasi berperisa. Yang membedakan masing-masing produk tersebut adalah jenis mikroba yang memfermentasi. Jenis mikroba yang berperan penting dalam fermentasi susu adalah kelompok bakteri asam laktat (BAL). Bakteri pada yakult adalah *Lactobacillus casei*, pada yoghurt adalah *L. bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Pada kefir yang berperan adalah bakteri asam laktat dan khamir (Wibowo 2002). Susu fermentasi diketahui mengandung bakteri asam laktat yang menghasilkan metabolit sekunder yang dapat menekan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit saluran pencernaan (Buckle, Edwards, Fleet & Wootton 1987). Selama proses fermentasi, bakteri asam laktat akan menghasilkan asam-asam organik (asam laktat, asam asetat, asam format), hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin yang bersifat antibakteri (Daeschel 1989).

Hasil penelitian Suseno (2000) menunjukkan minuman probiotik yang terbuat dari nira siwalan dan *Lactobacillus casei* dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhii* dan *Escherichia coli*. Penelitian Purwijantiningsih (2011) juga menunjukkan bahwa minuman yoghurt sinbiotik mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen enterik. Pada saat ini, produk susu fermentasi komersial telah banyak beredar di pasaran dengan berbagai merk dan jenis. Produk-produk tersebut mengklaim berperan dalam melindungi sistem pencernaan dengan cara menghambat pertumbuhan bakteri pathogen penyebab infeksi saluran pencernaan. Untuk itu penelitian ini dilakukan,

sehingga akan diperoleh suatu informasi ilmiah tentang antibakteri susu fermentasi komersial, sehingga dapat meningkatkan ketertarikan masyarakat untuk mengkonsumsinya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari produk susu fermentasi komersial terhadap bakteri patogen.

Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode difusi. Metode difusi dapat digunakan untuk mengetahui daerah hambat yang terbentuk mengelilingi obat berupa zona jernih yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap mikroorganisme yang diperiksa (Jawetz *et al.* 2007).

## B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat disusun perumusan masalah dalam penelitian ini yaitu :

1. Apakah pada produk susu fermentasi merek “X” dan “Y” memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 ?
2. Manakah dari produk susu fermentasi merek “X” dan “Y” tersebut yang mempunyai aktivitas antibakteri yang paling aktif terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 ?

## C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan dari penelitian ini adalah untuk :

1. Mengetahui aktivitas antibakteri pada produk susu fermentasi merek “X” dan “Y” terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.
2. Mengetahui diantara produk susu fermentasi merek “X” dan “Y” yang mempunyai aktivitas antibakteri yang paling aktif terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

#### **D. Kegunaan Penelitian**

Kegunaan penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang jenis produk susu yang efektif untuk mencegah atau memelihara saluran pencernaan dari infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan menjadikan produk susu tersebut sebagai salah satu alternatif terapi tambahan dalam pemeliharaan flora normal usus.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Susu Fermentasi**

Susu fermentasi didefinisikan sebagai produk susu yang melibatkan mikroba untuk menghasilkan flavour, warna, tekstur dan konsistensi yang diinginkan dan mampu mencegah *lactose intolerance*. Produk susu fermentasi yang umum dikonsumsi oleh masyarakat adalah yakult, yoghurt, kefir dan susu fermentasi berperisa. Yang membedakan masing-masing produk tersebut adalah jenis mikroba yang memfermentasi. Jenis mikroba yang berperan penting dalam fermentasi susu adalah kelompok bakteri asam laktat (BAL). Bakteri pada yakult adalah *Lactobacillus casei*, pada yoghurt adalah *L.bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Pada kefir yang berperan adalah bakteri asam laktat dan khamir (Wibowo 2002). Produk susu fermentasi pada saat ini banyak yang ditambah dengan bakteri probiotik, di antaranya *L. acidophilus* dan *Bifidobacterium* (Adriani 2010).

Bakteri probiotik merupakan bakteri yang dikonsumsi dalam keadaan hidup, bertahan hidup dalam saluran pencernaan setelah melalui rintangan enzim pada air liur, asam lambung dan garam empedu, mampu melekat pada saluran pencernaan, tidak beracun dan tidak patogen (Kaplan and Hutzins 2000). Penambahan bakteri probiotik ditujukan agar mempunyai efek fungsional bagi kesehatan (Irianto 2013). Selama proses fermentasi, bakteri asam laktat akan menghasilkan asam-asam organic (asam laktat, asam asetat, asam format), hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin yang bersifat antibakteri (Daeschel 1989).

Bahan pangan (makanan/minuman) merupakan medium pertumbuhan yang baik bagi bermacam-macam mikroorganisme. Pertumbuhan dan aktivitas mikroorganisme di dalam bahan pangan mengakibatkan kualitas pangan menjadi rusak dan terjadi pembentukan toksin. Bagi yang mengkonsumsinya dapat mengalami keracunan, bahkan kematian. Tidak semua mikroorganisme merugikan, ada mikroorganisme yang bersifat menguntungkan (Pelczar & Chan

1988). Keuntungannya yaitu dengan menghasilkan produk pangan khusus berupa pangan fermentasi seperti keju, tempe, tape, bir, anggur, *yoghurt* dan lain-lain yang dapat meningkatkan nilai gizi (Tarigan 1988). Pangan fermentasi adalah pangan yang dihasilkan dari fermentasi mikroorganisme dengan tekstur dan rasa yang lebih disukai daripada pangan biasa. Contoh pangan fermentasi yaitu *sour cream*, *yoghurt* dan *blue cheese* yang menggunakan bakteri sebagai mikroorganismenya dan susu sebagai media fermentasinya; minuman keras seperti bir dan *wine*, menggunakan mikroorganisme fungi dan media fermentasinya adalah air beras dan anggur; bumbu makanan Asia seperti *soy sauce* dan miso menggunakan fungi untuk memfermentasi kedelai (Nester *et al* 2001; Frazier & Westhoff 1988). Susu termasuk bahan pangan yang bernutrisi tinggi. Bentuknya cair dan memiliki pH 7,0. Bahan yang terkandung di dalam susu adalah air (sekitar 87 %), *casein* (2,5 %), laktosa (5 %), lemak (4 %), sisanya *lactalbumin* dan garam elektrolit (Alcamo 1997). Hal itu berarti susu merupakan media organik yaitu media yang tersusun dari bahan-bahan organik.

Proses fermentasi juga didefinisikan sebagai proses pemecahan karbohidrat dan asam amino secara anaerobik, yaitu tanpa memerlukan oksigen. Senyawa yang dapat dipecah dalam proses fermentasi terutama adalah karbohidrat, sedangkan asam amino hanya dapat difерентasi oleh beberapa jenis bakteri tertentu. Pada bakteri dikenal paling sedikit tiga jalur pemecahan glukosa (karbohidrat) yaitu: Jalur *Embden-Meyerhoff-Parnas* (EMP) atau glikolisis ditemukan pada fungi dan kebanyakan bakteri. Senyawa yang dihasilkan adalah asam laktat (pada BAL), etanol, dan CO<sub>2</sub> (pada khamir) (Fardiaz 1992). Jalur *Entner-Doudoroff* (ED) hanya ditemukan pada beberapa bakteri. Hasil akhir yang diperoleh berupa etanol. Jalur Heksamonofosfat (HMF) dan Fosfoketolase ditemukan pada bakteri tergolong laktobasili heterofermentatif. Senyawa akhir yang terbentuk adalah asam laktat, etanol, dan CO<sub>2</sub> (Boyd 1984). Di antara ketiganya yang berguna sebagai senyawa penghambat bakteri adalah asam laktat (Prangdimurti 2006).

Dalam fermentasi pangan, kecepatan pertumbuhan mikroorganisme sangat penting karena mempengaruhi hasil fermentasi. Kecepatan pertumbuhan itu

ditentukan oleh kondisi lingkungan. Untuk mendapatkan hasil fermentasi yang diinginkan, kondisi lingkungan perlu dijaga. Kondisi secara natural yang ada di dalam pangan seperti kelembaban, keasaman, dan nutrien disebut faktor intrinsik. Kondisi lingkungan seperti temperatur dan atmosfer (ada/tidaknya oksigen) penyimpanan pangan disebut faktor ekstrinsik (Nester *et al.* 2001).

## 1. Kelembaban

Produk pangan berubah secara drastis ketika air dapat diambil oleh mikroorganisme untuk tumbuh. Daging segar dan susu adalah contoh bahan pangan yang mempunyai banyak air dan dapat mendukung pertumbuhan mikroorganisme. Roti, kacang, dan makanan kering mempunyai lingkungan yang kering. Beberapa makanan yang kaya gula, seperti selai dan *jelly* yang nampaknya lembab, airnya tidak dapat digunakan oleh mikroorganisme karena air tersebut berinteraksi secara kimiawi dengan gula. Makanan yang mengandung garam tinggi mempunyai kelembaban yang sedikit (Nester *et al.* 2001).

*Water activity* ( $a_w$ ) digunakan untuk memperkirakan jumlah air dalam makanan. Air murni ber-  $a_w$ : 1.0. Makanan segar ber- $a_w$ : 0.98, ham ber- $a_w$ : 0.91, selai ber-  $a_w$ : 0.85, dan kue ber-  $a_w$ : 0.7. Bakteri biasanya membutuhkan  $a_w$  sekitar 0.9 untuk tumbuh, yang menjelaskan mengapa pangan yang kelembabannya tinggi dapat membusuk lebih cepat daripada makanan kering, bergula, atau makanan bergaram (Nester *et al.* 2001).

## 2. Kadar Keasaman

pH pangan juga penting untuk menentukan mikroorganisme yang bisa bertahan dan hidup dalam pH tersebut. Banyak bakteri termasuk yang patogen dihambat pertumbuhannya oleh kondisi asam dan tidak dapat tumbuh pada pH di bawah 4,5. Pengecualian untuk bakteri asam laktat yang dapat tumbuh pada pH rendah 3,5 dan digunakan untuk produksi pangan fermentasi seperti *yoghurt* dan *sauerkraut*. Grup bakteri ini memproduksi asam laktat sebagai hasil metabolisme fermentasi. Meskipun mereka berguna dalam produksi pangan yaitu tumbuh dan memproduksi asam, tapi mereka juga penyebab utama pembusukan susu yang tidak dipasteurisasi dan bahan pangan lain (Nester *et al.* 2001).

### **3. Nutrien**

Nutrien ada dalam makanan seperti faktor intrinsik lainnya yaitu menentukan jenis mikroorganisme yang dapat tumbuh di dalamnya. Mikroorganisme yang memerlukan vitamin tidak dapat tumbuh di dalam pangan yang kurang vitaminya. Kemampuan mikroba dalam mensintesis vitamin, dapat tumbuh jika kondisi lainnya baik (Nester *et al.* 2001).

### **4. Temperatur Penyimpanan**

Temperatur mempengaruhi kecepatan pertumbuhan mikroorganisme dalam makanan. Di bawah titik beku, air menjadi kristal dan tidak dapat diperoleh, pertumbuhan mikroba pun terhenti karena membutuhkan kelembaban. Pada suhu yang rendah, banyak reaksi enzim berjalan dengan lambat sehingga mikroorganisme tidak dapat tumbuh. Hal ini dapat mengurangi kecepatan pertumbuhan (Nester *et al.* 2001).

### **5. Atmosfer**

Ada atau tidaknya oksigen mempengaruhi populasi mikroorganisme yang tumbuh di dalam pangan. Contohnya *Pseudomonas* yang merupakan aerob obligat dan bakteri ini tidak dapat tumbuh dalam pangan yang disimpan pada kondisi tanpa oksigen. Tidak adanya oksigen dalam pangan memungkinkan pertumbuhan bakteri lain seperti anaerob obligat *Clostridium botulinum* (Nester *et al.* 2001).

## **B. Yoghurt**

Yoghurt adalah produk hasil fermentasi sekelompok bakteri asam laktat (BAL) terhadap susu yang telah dipasteurisasi (Surajudin *et al.* 2006). Beberapa manfaat yoghurt yang ditimbulkan oleh BAL dalam yoghurt yaitu mengatasi laktosa intoleran (Surajudin *et al.* 2006), menurunkan kadar kolesterol (Suarsana *et al.* 2005), menyeimbangkan sistem pencernaan (Shah 1999), mencegah kanker (Surajudin *et al.* 2006) dan mengatasi infeksi jamur dan bakteri (Felley *et al.* 2003).

Yoghurt dibuat melalui proses fermentasi yang melibatkan dua jenis bakteri yang bersahabat dengan tubuh kita. Keduanya adalah *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*. Para pakar gizi menyatakan, kedua

bakteri tersebut tergolong dalam bakteri asam laktat karena mampu menguraikan laktosa menjadi asam laktat. Kehadiran asam laktat ini yang kemudian membuat yoghurt berasa asam. Yoghurt ternyata dipercaya manfaatnya oleh berbagai bangsa di dunia. Bangsa India meyakini yoghurt sebagai obat perut yang mujarab. Susu asam ini mampu meredakan gangguan pencernaan yang umum dan mengembalikan keseimbangan tubuh. Tahap pembuatan yoghurt sebagai berikut :

### **1. Homogenisasi**

Perlakuan homogenisasi untuk mencegah timbulnya lapisan lemak (*cream layer*) pada permukaan yoghurt, sehingga diperoleh produk dengan tekstur yang halus. Homogenisasi dapat memecah globula – globula lemak menjadi kecil dan seragam, sehingga lebih stabil. Bila bahan dasar dicampur dengan bahan lain untuk meningkatkan jumlah zat padatnya maka proses homogenisasi dapat meratakan campuran, sehingga dapat menaikkan viskositas yang dihasilkan.

### **2. Pasteurisasi**

Tujuan dari pasteurisasi untuk menginaktifkan enzim dan juga membunuh mikrobia – mikrobia patogen dalam susu. Suhu pasteurisasi 85 – 90°C selama 10-15 menit. Dengan perlakuan pemanasan dapat mengurangi waktu koagulasi, karena setelah pemanasan terjadi penurunan pH. Terjadinya degradasi laktosa dapat terbentuk asam dengan cepat sehingga dapat menurunkan pH.

### **3. Pendinginan**

Dilakukan pendinginan dengan cepat untuk menghindari kontaminasi. Pendinginan dilakukan sampai suhu mencapai 37 – 45°C, merupakan suhu yang dapat digunakan untuk pertumbuhan *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*.

### **4. Inokulasi**

Inokulasi adalah penambahan bakteri pada susu setelah proses pendinginan yaitu pada suhu 37 – 45°C.

### **5. Inkubasi (fermentasi)**

Proses fermentasi dilakukan samapi diperoleh flavour yang khas, dengan kenampakan yang kental atau semi padat.

Khasiat dari yoghurt ini boleh dibilang sangat banyak, mulai dari merawat kulit, menetralkan racun, mengurangi sulit tidur (insomnia), serta mencegah diare. Selain itu, yoghurt mampu menambah kebugaran, mencegah kanker, radang paru-paru, dan memperkuat jantung. Sebuah studi yang dilakukan para peneliti dari Universitas Tennessee, Amerika Serikat menyatakan bahwa mengonsumsi yoghurt bisa menurunkan berat badan. (Republika 2006)

### C. Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat (BAL) adalah bakteri golongan Gram positif, tidak berspora dan mempunyai kemampuan dalam memfermentasi gula menjadi asam laktat (Singleton & Sainsbury 2001). Bakteri asam laktat (BAL) berbentuk batang, panjang dan berbentuk bulat, anaerob fakultatif (Fardiaz 1992). Bakteri asam laktat (BAL) yaitu jenis bakteri yang mampu memetabolisme laktosa untuk menghasilkan asam laktat. BAL memegang peranan penting dalam proses fermentasi. Fermentasi asam laktat pada umumnya terjadi dalam kondisi kekurangan (*anaerobic facultative*) atau tanpa oksigen sama sekali (obligat anaerob). Berdasarkan produk hasil akhir metabolismenya, BAL memiliki dua habitat ekologi, yaitu pada saluran pencernaan manusia atau hewan dan produk makanan atau minuman, baik sebagai kontaminan alami maupun sengaja ditambahkan untuk tujuan fermentasi.

BAL terutama banyak terdapat pada produk susu karena ketersediaan laktosa sebagai substrat utama untuk proses fermentasi (Mayra-Makinen dan Bigret 1998). Aplikasi BAL dalam produk makanan dan minuman sudah cukup banyak dilakukan, terutama pada produk-produk pangan fungsional. Tujuan penggunaan BAL ini pada umumnya adalah untuk menambah nilai fungsional produk yaitu fungsi perlindungan terhadap bakteri patogen dalam saluran pencernaan (probiotik). Pertumbuhan BAL dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya ialah keberadaan oksigen, kandungan air bebas, komposisi kimia dan ketersediaan substrat pada media pertumbuhan, total padatan, temperatur lingkungan pertumbuhan, dan keberadaan mikroba patogen awal (Surono 2004).

BAL mampu hidup pada berbagai habitat yang cukup luas di alam seperti pada tanaman, pada saluran pencernaan baik hewan maupun manusia, juga pada berbagai produk makanan fermentasi seperti : yogurt, minuman fermentasi, keju, saos, kedelai. Sifat terpenting dari BAL adalah kemampuannya untuk memfermentasi gula menjadi asam laktat. BAL dapat memproduksi asam laktat dan metabolit lain yang bersifat antibakteri sehingga pertumbuhan mikroorganisme lain dapat dihambat (Savadogo *et al.* 2000). Terdapat 8 genus bakteri asam laktat, yaitu: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* dan *Corinebacterium*. Berdasarkan tipe fermentasi, BAL dikelompokan menjadi 2, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif (Davidson dan Braner 1983). Kelompok homofermentatif menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dari fermentasi gula. Kelompok homofermentatif selama metabolisme sel yang difерентasi adalah gula pentosa dan yang dihasilkan adalah asam laktat dan asam asetat. BAL homofermentatif membentuk 90% atau lebih asam laktat murni. BAL homofermentatif sering digunakan dalam pengawetan makanan, karena produksi asam laktat dalam jumlah tinggi dalam makanan sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain yang dapat merusak makanan. Spesies yang termasuk homofermentatif diantaranya *Streptococcus*, *Pediococcus* dan beberapa *Lactobacillus* (Fardiaz 1992). Fermentasi oleh bakteri heterofermentatif akan memecah glukosa menjadi asam laktat dan senyawa lain seperti CO<sub>2</sub>, etanol, asetaldehid, diasetil serta senyawa lainnya. BAL sangat penting dalam memfermentasi makanan karena banyak menghasilkan komponen antimikroba, yaitu asam laktat, asam asetat, diasetil, hidrogen peroksida, CO<sub>2</sub> dan bakteriosin.

#### D. Media

Media adalah tempat bagi jaringan untuk tumbuh dan mengambil nutrisi yang mendukung kehidupan jaringan. Media tumbuh menyediakan berbagai zat yang diperlukan jaringan untuk hidup dan memperbanyak diri. Mikroba dapat tumbuh dan berkembang biak dengan baik, didalam media harus mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan

perkembangan mikroba. Media harus mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba. Media harus dalam keadaan steril artinya sebelum ditanami mikroba yang dimaksud, tidak ditumbuhkan mikroba lain (Abdurahman 2008).

### **1. Macam-macam bentuk media**

Bentuk media ada tiga jenis yaitu media padat, media setengah padat, media cair.

**1.1 Media padat.** Media padat diperoleh dengan cara menambahkan agar-agar. Agar berasal dari ganggang atau alga yang berfungsi sebagai bahan pemanis. Alga digunakan karena bahan ini tidak diuraikan oleh mikroorganisme, dan dapat membeku pada suhu 45°C. media padat terbagi menjadi media Agar miring dan Agar deep (Waluyo 2004).

**1.2 Media setengah padat.** Media setengah padat adalah media yang dibuat dengan bahan sama dengan media padat, akan tetapi yang berbeda adalah komposisi agarnya. Media ini digunakan untuk melihat gerak kuman secara mikroskopik (Waluyo 2004).

**1.3 Media cair.** Media cair juga dikenal sebagai media sintetik. Media sintetik merupakan media yang mempunyai kandungan dan isi bahan yang telah diketahui secara terperinci. Media sintetik sering digunakan untuk mempelajari genetika mikroorganisme. Senyawa anorganik dan senyawa organik yang ditambahkan dalam media sintetik harus murni. Contoh media sintetik adalah cairan Hanks, Locke, Eagel (Waluyo 2004).

### **2. Klasifikasi media**

**2.1 Media sintetik.** Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri kemoheterotrof. Pada uji kadar vitamin secara mikrobiologis, media yang digunakan harus mengandung semua faktor pertumbuhan yang dibutuhkan oleh bakteri kecuali vitamin yang diuji. Media, bahan media, dan bakteri disatukan, lalu bakteri diamati. Pertumbuhan bakteri yang sebanding dengan kadar asam laktat yang dihasilkan bakteri akan sebanding dengan jumlah vitamin dalam bahan uji (Radji 2010).

**2.2 Media kompleks.** Media yang sering digunakan secara rutin di laboratorium. Media ini mengandung nutrisi tinggi atas ekstrak ragi, ekstrak daging atau tumbuhan, ataupun protein sederhana dari sumber lain. Vitamin, mineral, dan bahan organic lain yang diperoleh dari ekstrak daging atau ragi merupakan sumber nutrisi untuk pertumbuhan bakteri. Media kompleks yang berbentuk cair disebut *nutrient agar* (Radji 2010).

**2.3 Media anaerob.** Penanaman bakteri anaerob harus menggunakan media spesial disebut *reducing media* yang mengandung natrium trioglikolat. Media ini sebelum digunakan dipanaskan perlakan-lahan untuk menghilangkan oksigen yang terserap. Bejana anaerob digunakan untuk menginkubasi bakteri anaerob yang diinokulasikan dalam media agar di dalam cawan petri (Radji 2010).

**2.4 Media biakan khusus.** Media ini digunakan untuk menentukan tipe pertumbuhan mikroba dan kemampuannya untuk mengadakan perubahan kimia tertentu. Bakteri aerob membutuhkan CO<sub>2</sub> dengan konsentrasi lebih tinggi ataupun lebih rendah dari pada konsentrasi CO<sub>2</sub> diudara, maka konsentrasi CO<sub>2</sub> pada media ini dinaikkan (Radji 2010).

**2.5 Media selektif dan diferensial.** Media ini digunakan untuk mendeteksi ada tidaknya bakteri spesifik yang berhubungan dengan penyakit atau sanitasi yang buruk. Media selektif dirancang untuk menekan pertumbuhan bakteri yang diinginkan. *Bismuth Sulfate Agar* (BSA) digunakan untuk mengisolasi bakteri *S. typhi* dari tinja. Media diferensial memudahkan perbedaan koloni bakteri yang diinginkan dari koloni lain yang tumbuh pada lempeng media yang sama. Karakteristik selektif dan diferensial kadang-kadang dikombinasikan di dalam satu jenis media (Radji 2010).

**2.6 Media pengayaan.** Media yang digunakan untuk pengayaan biakan bakteri biasanya dalam bentuk media cair dan hamper sama dengan media selektif, tetapi dirancang untuk memperbanyak tipe bakteri yang diinginkan sehingga dapat dideteksi. Tahapan pengayaan adalah upaya untuk menumbuhkan bakteri dalam beberapa kali pemindahan ke media yang baru. Ketika biakan pengayaan terakhir disebarluaskan diatas media padat yang mengandung komposisi

yang sama dengan media cair, hanya koloni yang mampu menggunakan fenol yang bertahan tumbuh (Radji 2010).

### E. Sterilisasi

Sterilisasi merupakan suatu tindakan untuk membebaskan alat dan media dari mikroba. Alat atau bahan dikatakan steril bila bahan atau alat tersebut bebas dari mikroba, baik dalam bentuk vegetatif maupun bentuk spora. Tindakan untuk membebaskan alat atau media dari jasad renik disebut dengan sterilisasi (Widyarto 2009). Sterilisasi dalam mikrobiologi merupakan proses penghilangan semua jenis organisme hidup, dalam hal ini adalah mikroorganisme (protozoa, fungi, bakteri, mycoplasma, virus) yang terdapat pada suatu benda. Proses ini melibatkan proses fisik dengan tujuan untuk membunuh atau menghilangkan mikroorganisme.

Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan basah dan kering, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar-X, sinar  $\alpha$ , sinar gamma dan sinar UV. Sterilisasi secara kimia yaitu penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin. Sterilisasi secara mekanik yaitu penggunaan saringan atau filter untuk bahan yang akan mengalami perubahan atau penguraian akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi (Darmandi 2008). Bahan atau peralatan yang dipergunakan di dalam mikrobiologi harus dalam keadaan steril, artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang akan mengganggu atau merusak media ataupun mengganggu kehidupan dan proses yang sedang dikerjakan (Suriawiria 2005).

Media yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan *autoclav* pada suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan *beaker glass* disterilkan dengan oven pada suhu 170°C -180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung. Sterilisasi inkas menggunakan formalin (Denyer 2004).

## F. Diare

Diare adalah frekuensi Buang Air Besar (BAB) yang abnormal akibat kondisi ketidakseimbangan absorbs air, sekresi air dan elektrolit dengan feses yang tidak terbentuk atau cair yang frekuensinya lebih dari 3 kali dalam 24 jam. Frekuesi dan konsistensi BAB bervariasi antar individu. Mekanisme kerja terjadinya diare infeksi meliputi penempelan bakteri pada sel epitel dengan atau tanpa kerusakan mukosa, invasi mukosa, dan produksi enterotoksin atau sitotoksin (Cielsa dan Guerrant 2003).

Beberapa hal yang dapat menyebabkan diare termasuk bakteri *Salmonella typhi*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli*, virus *Rotavirus*, *Norovirus*, parasit *Cryptosporidium*, Giardia, racun bakteri dari *Staphylococcus* dan beberapa senyawa seperti laksatif, antasida yang mengandung magnesium, antineoplastik, prostaglandin, dan obat antiinflamasi non steroid (Sukandar *et al.* 2013).

*Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit diare. Bakteri ini bekerja dengan mekanisme melalui enterotoksin dan invasi mukosa. Kebanyakan pasien yang terinfeksi bakteri ini mengalami gejala seperti diare (feses berlendir), mual dan kejang abdomen. Lamanya penyakit ini rata-rata 5 hari (Procop dan Cockerill 2003).

## G. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* merupakan bakteri flora normal pada saluran cerna, yang dapat menyebabkan infeksi atau diare sedang sampai berat pada saluran cerna manusia. Bakteri ini termasuk dalam famili Enterobacteriaceae yang dapat hidup dalam usus besar manusia dan hewan, dalam tanah dan dalam air (Jawetz *et al.* 2012). *Escherichia coli* dapat menyebabkan diare yaitu dengan mekanisme produksi enterotoksin yang secara tidak langsung menyebabkan kehilangan cairan dan dengan invasi yang sebenarnya lapisan epitelium dinding usus, yang menyebabkan peradangan dan kehilangan cairan (Jawetz *et al.* 2012).

### 1. Sistematika bakteri *Escherichia coli*

Menurut (Jawetz *et al.* 2012) *Escherichia coli* diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi	: Protophyta
Sub Devisi	: Schizomycetea
Class	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: Escherichia
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

## 2. Morfologi dan Identifikasi bakteri *Escherichia coli*

*Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang, berderet, dan merupakan flora paling banyak diusus, bergerak dengan flagel. Galur *E. coli* dapat menghasilkan enterotroksin yang tidak tahan panas, yang dapat meningkatkan sekresi air dan klorida dalam lumen usus dan menyebabkan hipermotilitas yang akan menyebabkan diare ringan pada anak-anak (Jawetz *et al.* 1986). *Escherichia coli* berbentuk batang pendek (cocobasil), Gram negatif dengan ukuran 0,4 – 0,7 µm x 1,4 µm. Sebagian besar bersifat motil (bergerak) dan beberapa strain memiliki kapsul (Supardi 1999).

*Escherichia coli* dapat tumbuh baik pada media Mc Conkey dan dapat memecah laktosa dengan cepat, juga dapat tumbuh pada media agar. Dapat merombak karbohidrat dan asam lemak menjadi asam dan gas serta dapat menghasilkan gas karbondioksida dan hidrogen (Pelczar dan Chan 1998).

Uji IMVIC dilakukan dengan menginokulasi biakan bakteri pada media Nutrien Agar (NA) ke dalam indol, metil merah, voges proskauer, dan sitrat (IMVIC). Hasil uji konfirmasi *Escherichia coli* positif bila uji IMVIC menunjukkan hasil uji indol positif yang ditandai dengan warna merah tua pada permukaan media; hasil uji metil merah positif yang ditandai dengan warna merah; hasil uji voges proskauer negatif yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna; dan hasil uji sitrat negatif yang ditandai dengan warna hijau (Maksum 2002).

*Escherichia coli* banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal, tetapi bila kesehatan menurun, bakteri ini dapat bersifat patogen terutama akibat toksin yang dihasilkan. *Escherichia coli* umumnya tidak

menyebabkan penyakit bila masih berada dalam usus, tetapi dapat menyebabkan penyakit pada saluran kencing, paru-paru, saluran empedu dan saluran otak (Jawetz *et al.* 2012). Sebagian besar penyakit yang disebabkan oleh *Escherichia coli* ditularkan melalui makanan yang tidak dimasak dan daging yang terkontaminasi. Penularan penyakit dapat terjadi melalui kontak langsung dan biasanya terjadi di tempat yang memiliki sanitasi dan lingkungan yang kurang bersih (Jawetz *et al.* 2012).

### **3. Sifat bakteri *Escherichia coli***

Bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 dapat diketahui sifat fisiologinya dengan inokulasi pada media-media yang dilakukan secara: mikroskopis, makroskopis, dan uji biokimia. Sifat fisologisnya yaitu *Escherichia coli* ATCC 25922 secara khas memberikan hasil positif pada uji indol, lisin dekarboksilase, dan fermentasi manitol serta menghasilkan gas dari glukosa (Jawetz *et al.* 2013).

### **4. Fisiologi *Escherichia coli***

*Escherichia coli* tumbuh baik dalam temperature antara 8°C - 48°C dan temperatur optimum 37°C, pH optimum untuk pertumbuhannya adalah pada pH 7-7,5, pH minimum 4 dan pH maksimum 9. *Escherichia coli* menghasilkan kolisin, yang dapat melindungi saluran pencernaan dari bakteri usus yang patogenik, dipakai sebagai indikator untuk menguji adanya pencemaran air dan tinja. *Escherichia coli* bersifat lateral yaitu peritrik dimana flagel tersebar dari ujung-ujung sampai pada sisi. Rata-rata pergerakan bakteri *Escherichia coli* kira-kira 25 m/detik atau 10 cm/jam. Flagel berguna untuk bergerak, melekat, dan konjugasi. *Escherichia coli* berada dalam medium yang mengandung sumber karbon maka akan mengubah derajat asam (pH) dalam medium menjadi asam dan akan membentuk gas sebagai hasil proses terurainya glukosa menjadi senyawa lain (Melliawati 2009).

### **5. Toksin *Escherichia coli***

*Escherichia coli* menghasilkan enterotoksin yang disebut *Enterotoksigenik Escherichia coli* (ETEC) dan mempunyai kemampuan untuk memasuki epitel

usus yang disebut dengan *Enteroinvasif Escherichia coli* (EIEC). Keadaan kurang baik seperti premature, usia tua, terserang penyakit dan setelah imunisasi, bakteri *Escherichia coli* dapat mencapai saluran darah dan terjadi sepsis. *Escherichia coli* diekstraksi dalam jumlah yang besar di dalam feses, menyababkan kontaminasi lingkungan termasuk tanah (Jawetz *et al.* 2012).

## 6. Patogenesis *Escherichia coli*

*Escherichia coli* patogenik penyebab diare diklasifikasikan menjadi 5 kelompok: kelompok *Escherichia coli* patogen yaitu *Escherichia coli* enteropatogenik (EPEC), *Escherichia coli* enterotoksigenik (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasif (EIEC), *Escherichia coli* Hemoragik (EHEC), dan *Escherichia coli* enteroaggregatif.

*Escherichia coli* praktis selalu ada dalam saluran pencernaan hewan dan manusia karena secara alamiah *Escherichia coli* merupakan salah satu penghuni tubuh. Penyebaran *Escherichia coli* dapat terjadi dengan cara kontak langsung (bersentuhan, berjabatan tangan) kemudian diteruskan melalui mulut. Penyebaran secara pasif dapat terjadi melalui makanan atau minuman (Melliawati 2009).

Gejala umum infeksi *Escherichia coli* diantaranya diare berdarah, mual muntah, nyeri abdomen, dank ram perut. Infeksi *Escherichia coli* pada bayi, anak-anak, lanjut usia, pada seseorang dengan sistem kekebalan tubuh yang rendah (penderita HIV/AIDS), dapat menimbulkan komplikasi yang menyebabkan kematian (Kusumaningsih 2010).

## H. Antibakteri

### 1. Pengertian Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa atau zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Dalam penggolongannya antibakteri dikenal dengan antiseptik dan antibiotik. Daya kerja antibiotik yaitu tidak membedakan antara mikroorganisme dan jaringan tubuh. Sedangkan antibiotik adalah zat-zat kimia yang dihasilkan oleh bakteri dan fungi, yang memiliki khasiat mematikan atau menghambat pertumbuhan kuman (Rostinawati 2009). Aktivitas antibakteri dibagi menjadi 2 macam yaitu aktivitas bakteriostatik (menghambat pertumbuhan tetapi tidak

membunuh patogen) dan aktivitas bakterisidal (dapat membunuh patogen dalam kisaran luas) (Brooks *et al.* 2005).

## 2. Mekanisme kerja antibakteri

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi dalam 5 kelompok yaitu: mengganggu metabolisme dinding sel bakteri, menghambat sintesis dinding sel bakteri, mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, menghambat sintesis protein sel bakteri, menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri (Odianti 2010).

**2.1 Penghambatan metabolisme sel bakteri.** Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antibakteri bila bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat non fungsional, sehingga kebutuhan asam folat tidak terpenuhi hal ini bisa menyebabkan bakteri mati (Odianti 2010). Contoh antibiotik sulfonamide dan trimethoprim (Bakung 2014).

**2.2 Penghambatan sintesis dinding sel.** Dinding sel bakteri terdiri atas polipeptidoglikan. Polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer glikopeptida. Salah satu kerja antibakteri adalah menghambat sintesis dinding sel. Struktur dinding sel dapat rusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Odianti 2010). Contoh antibiotik penisilin sefalosporin karbapenem, manobaktam, vancomycin (Bakung 2014).

**2.3 Perubahan permeabilitas membran sel bakteri.** Selaput sel berguna sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat-zat yang terlarut lainnya. Salah satu kerja antibakteri adalah mengubah tegangan permukaan sehingga merusak permeabilitas selektif dari membran sel mikroba. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain (Odianti 2010). Contoh antibiotik polimiksin, amfoterisin B, Gramicidin, nistatin (Bakung 2014).

**2.4 Penghambatan sintesis protein sel bakteri.** Untuk kehidupannya, bakteri perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Salah satu kerja antibakteri adalah menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein, akibatnya akan terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel mikroba (Odianti 2010). Contoh antibiotik adalah aminoglikosida, makrolida, tetrasiklin, streptogamin, kloramfenikol (Bakung 2014)

**2.5 Penghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri.** DNA, RNA dan protein memegang peranan penting dalam kehidupan normal sel. Salah satu kerja antibakteri yang lain adalah mekanisme berikatan dengan enzim polymerase RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut (Odianti 2010). Contoh antibiotik yang mengganggu sintesis DNA adalah metronidasol, kuinolon, novobiosin. Contoh yang mengganggu RNA seperti rifampisin (Bakung 2014).

## I. Metode Pengujian Antibakteri

### 1. Metode Difusi

Metode difusi adalah suatu uji aktifitas dengan menggunakan cakram yang berliang renik atau suatu silinder tidak beralas yang mengandung obat dalam jumlah tertentu ditempatkan pada pemberian padat yang telah ditanami dengan biakan bakteri yang akan diperiksa. Garis tengah daerah hambatan jernih yang mengelilingi obat dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap bakteri yang akan diperiksa setelah inkubasi. Metode ini zat yang akan ditentukan aktivitas anti mikrobanya berdifusi pada lempeng agar *Muller Hinton* yang telah ditanami mikroba yang akan diuji. Dasar penggunaannya adalah terbentuk atau tidaknya zona hambatan pertumbuhan bakteri disekeliling cakram atau silinder yang berisi zat anti mikroba (Harminta 2004).

Metode ini dapat dilakukan dengan tiga cara yaitu metode silinder, metode sumuran dan metode cakram kertas/*disc diffusion*. Metode sumur yaitu membuat sumuran pada agar padat yang telah diinokulasi mikroba. Sumuran pada media yang telah dibuat diinjeksikan dengan ekstrak yang akan diuji selanjutnya

diinkubasi dan dilakukan pengamatan pertumbuhan mikroba untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling sumuran (Kusmayati & Agustini 2007).

*Disc diffusion* dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (clear zone) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan mikroba oleh suatu senyawa antimikroba dalam ekstrak (Hermawan *et al* 2007). Faktor-faktor yang mempengaruhi metode difusi agar yaitu ketebalan medium agar, jumlah inoculum, komposisi media agar, suhu inkubasi, waktu inkubasi dan pH (Rostinawati 2009). Keuntungan metode difusi adalah lebih mudah, cepat, tidak membutuhkan alat dan bahan yang banyak, sehingga efektif sebagai pembanding. Kelemahan dari metode difusi adalah tidak dapat menentukan apakah suatu obat (agen kemoterapi) sebagai bakterisidal dan bukan hanya bakteriostatik (Jawetz *et al* 1986).

### J. Amoksisilin

Amoksisilin merupakan penisilin semisintetik yang rentan terhadap penisilinase dan secara kimia serta farmakologi berhubungan dengan ampicilin. Antibiotik golongan penisilin berkerja dengan cara menghambat pembentukan mukopeptida yang diperlukan untuk sintesis dinding sel mikroorganisme (Wardani 2008). Bakteri Gram negatif yang sensitif terhadap amoksisilin adalah *Haemophilus influenza*, *Escherichia coli*, dan *Proteus Mirabilis*. Amoksisilin merupakan antibakteri spektrum luas yang bersifat bakterisid dan efektif terhadap sebagian bakteri Gram positif dan Gram negatif yang patogenik (Werckenthin 2009; Pengov 2012). Antibiotik ini stabil dalam suasana asam dan dirancang untuk penggunaan oral. Absorpsi amoxicillin dari gastrointestinal lebih cepat dan lebih sempurna daripada ampicilin karena absorbs amoxicillin tidak terganggu dengan adanya makanan dan minuman (Goodman & Gilman 2007).

### K. Landasan Teori

Bahan pangan (makanan/minuman) merupakan medium pertumbuhan yang baik bagi bermacam-macam mikroorganisme. Pertumbuhan dan aktivitas mikroorganisme di dalam bahan pangan mengakibatkan kualitas pangan menjadi

rusak dan terjadi pembentukan toksin. Terdapat mikroorganisme yang merugikan dan ada mikroorganisme yang bersifat menguntungkan (Pelczar & Chan 1988). Keuntungannya yaitu dengan menghasilkan produk pangan khusus berupa pangan fermentasi seperti keju, tempe, tape, bir, anggur, yoghurt dan lain-lain yang dapat meningkatkan nilai gizi (Tarigan 1988).

Susu merupakan bahan makanan bernilai gizi tinggi. Susu sebagian besar digunakan sebagai produk pangan yang diperoleh dari hasil pemerasan hewan seperti sapi dan kambing. Komponen-komponen penting dalam susu adalah protein, lemak, vitamin, mineral, laktosa, enzim, dan beberapa mikroba. Komponen dan karakteristik zat gizi yang terdapat dalam susu mudah diserap dan digunakan oleh tubuh hewan atau manusia (Buckle *et al.* 2007).

Susu fermentasi diketahui mengandung bakteri asam laktat (BAL) yang dapat menekan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit saluran pencernaan. Salah satu produk susu fermentasi yang sudah beredar di Indonesia bahkan mancanegara adalah susu fermentasi merek “X” dan “Y”. Produk ini mengandung bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat dapat menghambat bakteri patogen dan bakteri pembusuk (flora normal yang berpotensi patogen), seperti *Escherichia coli* yang mempunyai habitat di usus besar dan urogenital manusia.

Bakteri asam laktat (BAL) adalah bakteri Gram positif, berbentuk batang tumbuh sama baiknya di lingkungan yang memiliki O<sub>2</sub> dan tidak memiliki O<sub>2</sub> sehingga termasuk anaerob aerotoleran (Madigan 2006). Penambahan bakteri probiotik ditujukan agar mempunyai efek fungsional bagi kesehatan (Irianto 2013). Bakteri probiotik hidup dalam produk berbasis susu sebanyak 10<sup>7</sup> CFU/ml, dan pada konsentrasi 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> CFU/ml BAL cukup untuk produk probiotik (Kullen & Klaen 1999).

Asam laktat mampu merusak permeabilitas membran luar bakteri Gram negatif dengan merusak membran luar bakteri Gram negatif. Asam laktat merupakan molekul yang larut dalam air sehingga mampu menembus ke dalam periplasma bakteri Gram negatif melalui protein porin pada membran luar. Pelindung permeabilitas membran luar adalah lapisan lipopolisakarida (LPS) yang terletak pada permukaan membran dirusak oleh asam laktat. Dengan rusaknya

membran luar sel, maka senyawa antimikroba yang lain, diantaranya diasetil, hidrogen peroksida dan bakteriosin akan masuk ke dalam membran sitoplasma merusak aktivitas intraseluler yang pada akhirnya dapat mematikan sel (Alakomi *et al.* 2000).

Target kerja bakteriosin asal bakteri asam laktat adalah membran sitoplasma sel bakteri sensitif (Venema *et al.* 1993) sehingga dapat menimbulkan akibat fatal bagi kelangsungan hidup sel tersebut. Semua sel hidup dibatasi oleh membran sitoplasma yang bersifat selektifpermeable, melakukan pengangkutan aktif, sehingga berperan dalam mengendalikan komponen dalam sel. Apabila integritas fungsi sel sitoplasma terganggu maka substansi yang terdapat di dalam sel akan lolos dari sel sehingga menimbulkan kerusakan atau kematian sel (Drider *et al.* 2006).

Hasil penelitian Suseno (2000) menunjukkan minuman probiotik yang terbuat dari nira siwalan dan *Lactobacillus casei* dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhii* dan *Escherichia coli*. Penelitian Purwijantiningsih (2011) juga menunjukkan bahwa minuman yoghurt sinbiotik mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen enterik. Hasil penelitian Poeloengan (2012) menunjukkan bahwa bakteri Gram negatif (*Salmonella thypi* dan *Escherichia coli*) cenderung lebih mudah dihambat oleh yoghurt probiotik dibandingkan bakteri Gram positif.

Pemberian BAL dapat menurunkan pH bahan pangan, penurunan pH tersebut dapat memperlambat pertumbuhan mikroorganisme pembusuk (Buckle *et al.* 1987). BAL juga dapat menghasilkan senyawa bersifat antibakteri (Ruzana 2011). Efek antimikroba BAL secara umum disebabkan karena produksi asam laktat yang menurunkan pH lingkungan.

Penyakit gangguan pencernaan salah satunya adalah penyakit diare, diare dapat disebabkan oleh keracunan makanan, selain itu diare dapat disebabkan karena infeksi bakteri *Escherichia coli*. *Escherichia coli* adalah bakteri Gram negatif, berbentuk batang pendek, berderet seperti rantai, dapat memfermentasi glukosa dan laktosa membentuk asam dan gas. *Escherichia coli* dapat tumbuh baik pada media Mc Conkey dan dapat memecah laktosa dengan cepat, juga dapat

tumbuh pada media agar. Dapat merombak karbohidrat dan asam lemak menjadi asam dan gas serta dapat menghasilkan gas karbondioksida dan hidrogen (Pelczar dan Chan 1998). *Escherichia coli* berbentuk batang pendek (cocobasil), Gram negatif dengan ukuran  $0,4 - 0,7 \mu\text{m} \times 1,4 \mu\text{m}$ . Sebagian besar bersifat motil (bergerak) dan beberapa strain memiliki kapsul (Supardi 1999).

*Escherichia coli* banyak ditemukan di dalam usus halus manusia sebagai flora normal, tetapi bila kesehatan menurun, bakteri ini dapat bersifat patogen terutama akibat toksin yang dihasilkan (Jawetz *et al.* 2012). Organisme ini menjadi patogen bila mencapai jaringan di luar saluran pencernaan khususnya saluran air kemih menyebabkan ISK (Infeksi Saluran Kemih). *Escherichia coli* juga dapat menyebabkan infeksi primer pada usus, misalnya diare pada anak (Gillespie & Bamford 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri yang dihasilkan BAL dari produk susu fermentasi merek “X” dan “Y” terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi.

## L. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori yang ada, dapat disusun suatu hipotesis dalam penelitian ini yaitu:

Pertama, susu fermentasi merek “X” dan “Y” mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, susu fermentasi merek “X” lebih aktif membunuh bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk susu (susu fermentasi merek “X” dan “Y”) yang diperoleh dari daerah Surakarta.

##### **2. Sampel**

Sampel yang digunakan yaitu produk susu susu fermentasi merek “X” (dengan kandungan bakteri *Lactobacillus Casei Shirota*) dan “Y” (dengan kandungan bakteri *Lactobacillus Bulgaricus* dan *Streptococcus Thermophilus*) yang diperoleh dari daerah Mojosongo.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah susu fermentasi merek “X” dan “Y”.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari senyawa yang terdapat dalam susu fermentasi merek “X” dan “Y” terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel kendali dan variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja di ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel kendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah susu fermentasi merek “X” dan “Y” dalam berbagai konsentrasi.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, kondisi laboratorium (meliputi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian ini.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri yang dapat dilihat dari pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media uji.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, susu fermentasi adalah suatu produk susu fermentasi merek “X” yang mengandung kelompok bakteri asam laktat (BAL) adalah *Lactobacillus casei*, sukrosa dan susu skim. Konsistensinya berbentuk cair dan dikemas di dalam botol plastik bervolume 75 ml. Bahan-bahan pada susu fermentasi merek “X” terdiri dari bakteri, susu bubuk skim, sukrosa, glukosa, aroma, dan air. Kandungan gizi di dalam susu fermentasi merek “X” (kalori 48 kcal) adalah protein 0,8 g; lemak 0,0 g; karbohidrat 11,3 g; kolesterol tidak terdeteksi; Kalsium 28,0 g; Natrium 7,8 mg; Kalium 31,2 mg; Indeks *glycaemic* 46 (rendah). Produk ini berasal dari Jepang dan telah diproduksi dan dipasarkan di banyak negara termasuk Indonesia. Yang didapatkan dari daerah Surakarta.

Kedua, Yoghurt probiotik kemasan merek “Y” adalah produk hasil fermentasi sekelompok bakteri asam laktat (BAL) adalah *L. Bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*, terhadap susu yang telah dipasteurisasi dalam kemasan yang didapatkan dari daerah Surakarta.

Ketiga, bakteri uji dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Keempat, Senyawa antibakteri adalah senyawa yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri uji *E. coli*.

Kelima, Potensi antibakteri adalah kemampuan bakteri asam laktat (BAL) yang dihasilkan dari susu fermentasi merek “X” dan “Y” dalam menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji *E. coli* dengan menunjukkan diameter zona hambat yang lebih besar daripada diameter zona hambat kontrol negatif.

Keenam, metode difusi adalah metode untuk uji aktivitas antibakteri. Metode difusi menggunakan media MHA dalam cawan petri yang mempunyai diameter dan ketebalan media tertentu. MHA diratakan permukaannya dengan suspensi bakteri uji yang dioleskan pada permukaan media MHA sampai rata kemudian meletakan cakram di atas media yang sudah direndam dalam produk susu fermentasi merek “X” dan “Y”, serta kontrol negatif aquadest dan kontrol positif Amoxicillin, lalu mengamati diameter zona hambat.

### C. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain Bunsen, kasa, corong kaca, cawan petri, penangas air, labu Erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung, gelas ukur, corong pisah, inkas, jarum Ose, kapas steril, spidol, batang pengaduk, autoklaf, inkubator, Beaker glass, pipet ukur, kaca obyek, deckglass, dan mikroskop.

#### 2. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu fermentasi merek “X” dan “Y”, *Esherichia coli* ATCC 25922, aquadest, larutan standart Mc Farland 0,5.

Media agar yang digunakan pada penelitian ini adalah *deMan Rogosa and Sharpe Agar* (MRSA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Endo Agar* (EA), *Nutrient agar* (Na), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Sulfide Indol Motilitas* (SIM), *Kliger Iron Agar* (KIA), *Lysin Iron Agar* (LIA), sitrat.

### D. Jalannya Penelitian

#### 1. Sterilisasi alat

Media yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm. Alat-alat dari gelas yang ada ukurannya disterilkan dengan oven pada suhu 170-180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum Ose disterilkan dengan pemanasan api langsung (Jawetz *et al.* 2012).

## 2. Isolasi Bakteri dalam susu fermentasi merek “X” dan “Y”

Isolasi bakteri dari susu fermentasi merek “X” dan yoghurt probiotik merek “Y” dilakukan dengan metode *streak plate*. Masing-masing satu Ose susu fermentasi merek “X” dan “Y” diinokulasikan ke dalam Medium MRSA pada cawan petri secara goresan. Tahap selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Kemudian di amati koloni yang terbentuk.

## 3. Identifikasi Bakteri dari dalam susu fermentasi merek “X” dan “Y”

**3.1 Pengamatan Morfologi Koloni.** Pengamatan morfologi koloni meliputi bentuk koloni, bentuk tepi, elevasi dan warna koloni pada media MRSA.

**3.2 Pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram dilakukan untuk membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteri uji diulaskan diatas kaca objek dan difiksasi diatas api. Dibuat pulasan isolat bakteri dari susu fermentasi merek “X” dan yoghurt probiotik merek “Y” di atas obyek gelas, kemudian difiksasi dengan api. Pulasan tersebut ditetesi kristal violet dan didiamkan selama 1 menit. Setelah itu dicuci dengan air mengalir untuk membuang sisa zat warna. Larutan iodin diteteskan ke atas pulasan tersebut dan didiamkan selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditambahkan alkohol sebagai larutan peluntur. Pulasan tersebut dicuci dengan air mengalir lagi dan diberi larutan safranin. Langkah berikutnya pulasan yang telah diberi safranin tersebut dicuci dengan air mengalir dan dibiarkan mengering. Setelah itu diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000X menggunakan minyak emersi. Pada pengamatan sifat Gram, apabila warna sel adalah violet, menunjukkan bahwa bakteri tersebut termasuk bakteri Gram positif. Namun, sebaliknya bila warna merah yang terjadi, berarti bakteri tersebut merupakan bakteri Gram negatif.

**3.3 Pengecatan acid fast.** Pengecatan acid fast termasuk pengecatan diferensial karena dapat membedakan bakteri-bakteri yang *acid fast* (tahan terhadap pencucian asam) dan yang *non acid fast* (tidak tahan terhadap pencucian asam). Membuat pulasan isolat bakteri dari susu fermentasi merek X dan Y di atas obyek gelas dan memfiksasinya di atas pembakar spiritus. Lalu

larutan *carbolfuchsin* ditambahkan di atasnya. Setelah itu, didiamkan selama 1 menit. Setelah 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan diangin-anginkan. Dicuci dengan alkohol 96 % sambil digoyang-goyangkan sampai seluruhnya tidak tampak. Sesudah itu, dicuci dengan air mengalir dan diangin-anginkan. *Methylen blue* diteteskan di atas obyek gelas dan didiamkan selama 20-30 detik. Dicuci, dikeringkan dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat sampai 1000X menggunakan minyak emersi. Bakteri yang bersifat *acid fast* tampak berwarna merah, sedangkan yang *non acid fast* berwarna biru.

**3.4 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 pereaksi  $H_2O_2$  pada tabung reaksi yang berisi medium NB (*Nutrien Broth*) yang telah diinokulasi dengan bakteri ditunggu beberapa detik sampai terbentuknya gelembung gas. Uji ini akan bersifat positif bila terbentuk gelembung gas  $O_2$  dan bakteri bersifat negatif apabila bakteri tidak dapat menghasilkan enzim katalase yang mampu mengkatalisis penguraian  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$  pada medium yang mengandung bakteri tersebut setelah didiamkan beberapa detik.

#### **4. Identifikasi makroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 pada medium diferensial**

Suspensi bakteri uji *Escherichia coli* diinokulasi pada media diferensial *Endo Agar* (EA) dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif dikatakan bila penampakan koloni merah dengan kilat logam yang permanen dan warna medium merah violet (Kayser FH 2005).

#### **5. Identifikasi mikroskopis *Escherichia coli* dengan pewarnaan Gram**

Pewarnaan dilakukan untuk meyakinkan bahwa bakteri tersebut golongan *Escherichia coli*. Gram negatif didapatkan bila sel bakteri berwarna merah, bentuk bacilli berarti positif golongan *Escherichia coli*. Perwanaan Gram dilakukan dengan cara buat preparat ulas (smear) yang difiksasi kemudian tetes Kristal Violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama kurang lebih 1 menit. Cuci dengan air mengalir

kemudian tetesi mordant (*lugol,s iodin/Gram B*), diamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian dicuci lagi dengan air mengalir dan dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan Gram C (etanol) lalu cuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Larutan safranin diberikan selama 3 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Minyak emersi diberikan diatas kaca preparat bakteri. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x100 kali (Madigan 2003).

## 6. Identifikasi *Escherichia coli* dengan uji biokimia

Pertama uji biokimia SIM (*Sulfide Indol Motility*). Biakan bakteri ditusuk pada media SIM kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Uji sulfida positif bila medium berwarna hitam, uji indol positif bila berbentuk warna merah setelah pertumbuhan reagen erlich, uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media. (Hafizluengdaneum 2008).

Kedua uji KIA (*Kliger's Iron Agar*). Pengujian media KIA dilakukan pengamatan pada bagian lereng, dasar, ada tidaknya gas dan terbentuk warna hitam. Biakan bakteri ditusuk dan gores lalu inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Amati adanya warna kuning pada bagian lereng dan pada bagian dasar, perubahan adanya media yang pecah atau terangkat ke atas menunjukkan adanya gas, warna media yang tidak berubah warna hitam menunjukkan uji sulfida negatif (Raihana 2010).

Ketiga uji LIA (*Lysin Iron Agar*). Pengujian media LIA dilakukan pengamatan pada bagian lereng, dasar, dan adanya sulfida. Biakan bakteri diinokulasi pada bagian media LIA yang akan diamati dengan cara inokulasi tusuk dan gores, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Diamati adanya perubahan warna merah coklat ungu , atau kuning pada bagian lereng dan dasar media LIA. Perubahan warna hitam pada media LIA menunjukkan uji sulfida positif (Haryani 2012).

Keempat uji citrat. Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi goresan pada permukaan media kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Uji positif bila media berwarna biru (Suyati 2010).

## 7. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri uji diambil dari biakan murni pada media *Nutrient Agar* (NA), diambil kurang lebih 2 Ose dan ditanam pada media BHI (*Brain heart Infusien*), kemudian diencerkan dengan aquadest steril sampai didapatkan kekeruhan yang disamakan dengan *Mc Farland* 0,5 dengan jumlah koloni  $1\times10^7$ - $1\times10^8$  CFU/ml. (Bonang & Koeswardono 1982).

## 8. Pengujian Potensi Antibakteri dari Produk Susu Fermentasi merek ‘‘X’’ dan ‘‘Y’’

**8.1 Pengujian daya hambat menggunakan Kertas Cakram.** Isolat bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 diinokulasikan pada medium MHA dengan metode dioleskan dengan kapas lidi steril dan dibiarkan berdifusi selama 30 menit. Sementara itu siapkan kertas cakram steril lalu direndam dalam masing-masing suspensi produk susu fermentasi merek X dan Y selama 10 menit, aquadest sebagai kontrol negatif, serta antibiotik amoksisilin sebagai kontrol positif. Kertas cakram diletakkan di media MHA yang telah di inokulasikan bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 yang telah terdifusi kimedia, untuk perlakuan pertama diinkubasi selama 24 jam dan untuk perlakuan kedua diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37°C. Diameter zona bening yang terbentuk diukur dengan menggunakan mistar dengan ketelitian 1 mm. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

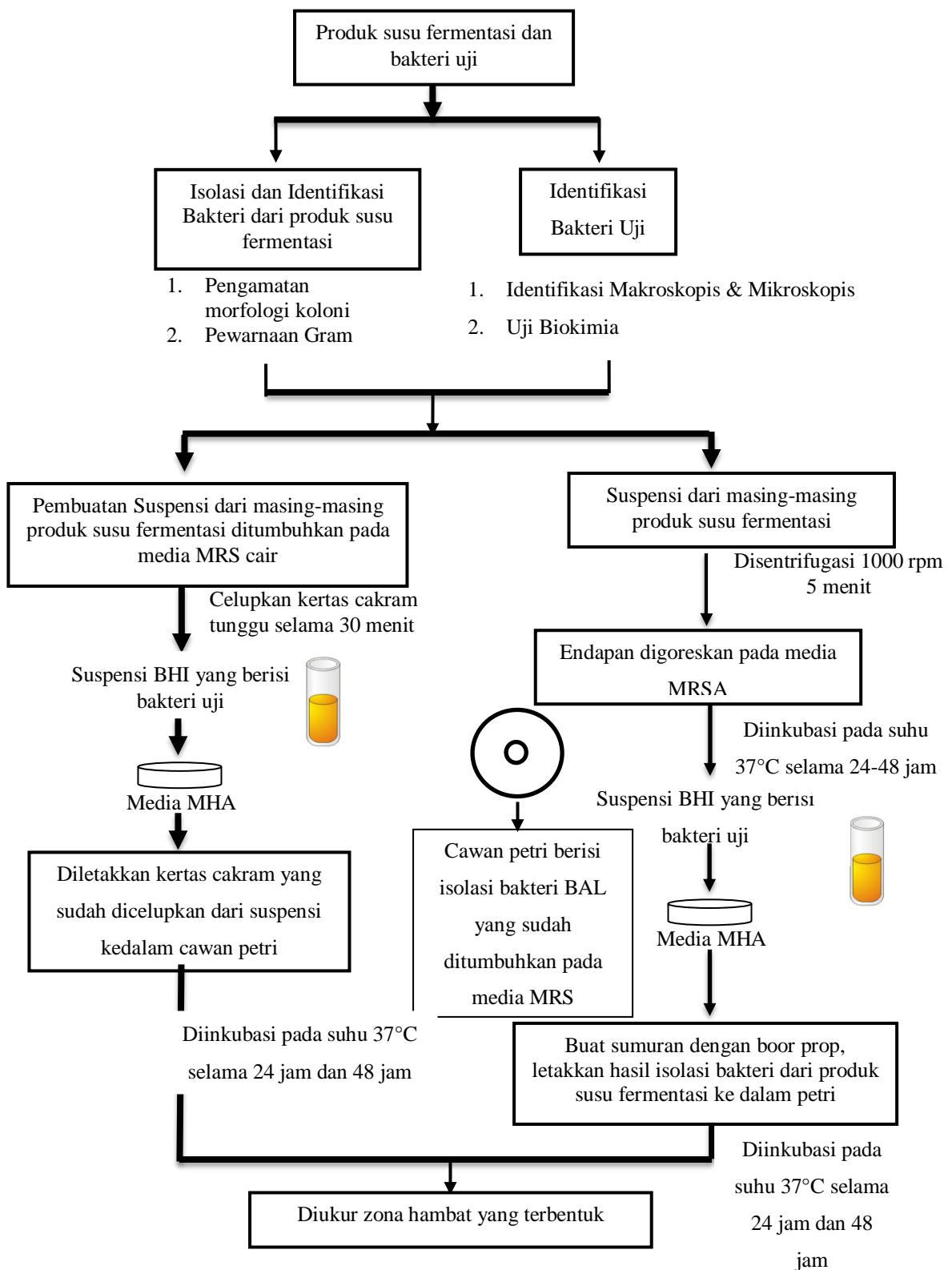
**8.2 Pengujian daya hambat antibakteri dengan Sumuran.** Uji antibakteri yang digunakan adalah sumuran. Prinsip dari metode ini adalah penghambatan pertumbuhan terhadap mikroorganisme, yaitu zona hambatan akan terlihat jernih disekitar zona yang mengandung zat antibakteri (Harmita & Radji 2005). Masing-masing susu fermentasi merek ‘‘X’’ dan yoghurt probiotik merek ‘‘Y’’ disentrifuge sebanyak 5 ml kecepatan 1000 rpm selama 5 menit sampai pellet dan supernatan terpisah. Supernatan kemudian diinokulasikan dengan kapas lidi steril kedalam media MRS. Lalu diinkubasi selama 2-3 hari pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi dibuat suspensi bakteri Bakteri Asam Laktat (BAL) kedalam media MRS cair dari susu fermentasi merek X dan Y yang telah di sentrifuge sebagai kelompok uji, aquadest sebagai kontrol negatif, serta antibiotik

amoxicillin sebagai kontrol positif. Dituang media *Mueller Hinton Agar* (MHA) pada cawan petri steril sebanyak 60 mL, biarkan mengeras pada suhu ruang. Setelah mengeras secara aseptis di inokulasikan bakteri *Escherichia coli*, lalu pipet sebanyak 50  $\mu$  hasil isolasi bakteri dari media MRS cair ke media MHA yang sudah dibuat sumuran sebelumnya, dan diinkubasi. Untuk perlakuan pertama diinkubasi selama 24 jam dan perlakuan kedua diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Lalu diamati zona hambat yang terbentuk dan adanya daerah jernih, lalu diukur kemampuan zona hambat.

#### E. Analisis Data

Hasil penelitian dari uji aktivitas antibakteri dari susu fermentasi merek “X” dan “Y” terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dianalisis berdasarkan nilai zona hambat yang terbentuk menggunakan metode difusi. Hasil data yang diperoleh dilakukan analisa dengan menggunakan uji *Kolmogorof-Smirnov* untuk mengetahui normalitas data, sedangkan kehomogenan varian diuji dengan uji *levene*. Apabila  $P>0.05$ , maka data terditribusi normal dan homogen untuk setiap varian dan dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way* atau *Two Way Anova*. Jika terdapat perbedaan yang bermakna, dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) dengan taraf kepercayaan 95%. Apabila data terdistribusi tidak normal, maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan jika perbedaan bermakna dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Data yang diperoleh dianalisi menggunakan SPSS statistik 17.

### F. Skema Jalannya Penelitian



**Gambar 1. Skema jalannya penelitian**

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Isolasi Bakteri dalam Susu Fermentasi merek X dan Y dengan Metode *Streak Plate***

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

Media yang digunakan untuk isolasi bakteri asam laktat dalam susu fermentasi merek X dan Y adalah media MRSA (*de Man Rogosa Sharpe Agar*) karena media ini digunakan untuk pertumbuhan dan identifikasi bakteri asam laktat yang diduga terdapat dalam susu fermentasi. Berdasarkan komposisinya, media MRSA merupakan media yang diperkaya (Jutono *et al.* 1980). Komposisi media dapat dilihat pada lampiran 1.

Penelitian ini menggunakan media MRSA karena media ini mempunyai komponen yang menyerupai komponen susu seperti protein (pepton), karbohidrat (glukosa) dan lemak (*lab-lemco powder*). Oleh karena itu bakteri dalam susu fermentasi merek X dan Y dapat tumbuh, diisolasi dan menghasilkan senyawa sebagai hasil fermentasi dengan menggunakan media MRSA. Koloni-koloni mikroba tumbuh setelah diinkubasi 48 jam terbentuk sepanjang goresan pada permukaan agar. Koloni hasil *streak plate* berbentuk *circular* (bulat), permukaannya licin, elevasinya *convex* (cembung), bentuk tepinya *entire* (rata) dan berwarna putih. Gambar hasil dapat dilihat pada lampiran 2.

## B. Identifikasi Isolat Bakteri dari Susu Fermentasi merek X dan Y

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

### 1. Identifikasi Makroskopis Bakteri dalam Susu Fermentasi Merek X dan Y

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 cawan, maka dilakukan pengamatan pada pertumbuhan, bentuk, permukaan, elevasi, bentuk tepi koloni (Jutono *et al* 1980). Menurut (Holt *et al* 2000) koloni *Lactobacillus* pada media agar berukuran 2-5 mm, konveks (cembung), *entire* (rata), *opaque* (tidak dapat ditembus cahaya), dan tanpa pigmen. Hasil gambar dapat dilihat pada lampiran 2.

**Tabel 1. Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Isolat Bakteri dalam Susu Fermentasi merek X dan Y**

Medium	Morfologi Koloni yang diamati	Morfologi Koloni Bakteri dalam Susu Fermentasi merek X	Morfologi Koloni Bakteri dalam Susu Fermentasi merek Y	Morfologi Koloni <i>Lactobacillus sp.</i> (Holt <i>et al</i> 2000)
MRSA	Pertumbuhan Bentuk koloni Permukaannya Elevasi Bentuk tepi Bentuk struktur dalam	Tumbuh koloni di permukaan <i>Circular</i> (bulat) <i>Smooth</i> (licin) <i>Convex</i> <i>Entire</i> (rata) <i>Opaque</i>	Tumbuh koloni di permukaan <i>Circular</i> (bulat) <i>Smooth</i> (licin) <i>Convex</i> <i>Entire</i> (rata) <i>Opaque</i>	- - - <i>Convex</i> <i>Entire</i> (rata) <i>Opaque</i>

### 2. Pengecatan Gram bakteri dalam susu fermentasi merek X dan Y

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 fisik 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 lapisan 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/ 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 susu fermentasi merek X dan Y 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 dapat dilihat pada lampiran 3.

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

Pengecatan *acid fast* termasuk pengecatan diferensial karena dapat 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 keadaan 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 (*acid fast*) 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

*metylen blue*, bakteri yang tidak tahan asam akan berwarna biru (Lay 1994).

Dari hasil yang diperoleh bakteri yang terkandung dalam susu fermentasi merek X dan Y berwarna biru sehingga bakteri tersebut merupakan bakteri tidak tahan asam (*non acid fast*). 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 *metylen 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 (*Nutrien Broth*) 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 dalam susu fermentasi merek X dan Y, 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 *Escherichia coli* ATCC 25922 pada Media Selektif

Identifikasi mikroskopis *Escherichia 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 *Escherichia coli* ATCC 25922 berwarna merah dengan logam mengkilap pada media *Endo Agar* (EA). Gambar hasil identifikasi mikroskopis dapat di lihat dalam lampiran 5.

## D. Hasil Identifikasi Mikroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan Pewarnaan Gram

Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 termasuk kedalam bakteri Gram negatif dilihat dari sel yang berwarna merah. Gambar hasil identifikasi secara mikroskopis dapat di lihat dalam lampiran 6.

## E. Hasil Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 Berdasarkan Uji Biokimia

**Tabel 2. 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(-)
CITRAT	-	-

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 *Escherichia 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 *Escherichia 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 *Escherichia 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

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.

Medium Citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian citrat menunjukkan hasil negatif, hal ini menunjukkan bahwa *Escherichia coli* tidak menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Medium Citrat 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 *Escherichia coli* ATCC 25922. Hasil gambar dapat dilihat pada lampiran 7.

#### F. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan suspensi bakteri menggunakan media BHI dan distandardkan 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 distandardkan dengan Mc. Farland 0,5 dimungkinkan bakteri terlalu banyak atau terlalu sedikit sehingga mempengaruhi hasil penelitian. Hasil gambar dapat dilihat pada lampiran 8.

### G. Uji Potensi Antibakteri dari Susu Fermentasi Merek X dan Y

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi dengan kertas cakram dan sumuran untuk mengetahui hambatan pertumbuhan terhadap bakteri uji. Pengujian aktivitas senyawa antibakteri dari susu fermentasi merek X dan Y dilakukan dengan waktu inkubasi masing-masing selama 24 jam dan 48 jam untuk mengetahui potensi aktivitas antibakteri dalam produk susu fermentasi merek X dan Y yang efektif. Kontrol positif menggunakan antibiotik amoksisilin dan kontrol negatif menggunakan aquades. Hasil pengukuran diameter zona hambat dapat dilihat pada tabel 3 dan 4.

**Tabel 3. Hasil pengujian aktivitas antibakteri susu fermentasi merek X dan Y terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan menggunakan kertas cakram**

Sampel	Waktu inkubasi	Diameter hambat (mm)			Rata-rata (mm) ± SD
		Replikasi			
		1	2	3	
Sampel X	24 Jam	12	11,5	11,5	11,66 ± 0,28 <sup>bcd</sup>
Sampel Y		11	11,5	10,5	11 ± 10,33 <sup>acd</sup>
Kontrol +		15	15	15	15 ± 0 <sup>abd</sup>
Kontrol -		0	0	0	0 ± 0 <sup>abc</sup>
Sampel X	48 Jam	10	11,5	11	10,83 ± 0,76 <sup>bcd</sup>
Sampel Y		10	10,5	10,5	10,33 ± 0,28 <sup>acd</sup>
Kontrol +		15	14,5	15	14,83 ± 0,28 <sup>abd</sup>
Kontrol -		0	0	0	0 ± 0 <sup>abc</sup>

Keterangan :

Kontrol + : Amoksisilin

Kontrol - : Aquades

a : berbeda signifikan terhadap sampel X ( $p<0,05$ )

b : berbeda signifikan terhadap sampel Y ( $p<0,05$ )

c : berbeda signifikan terhadap kontrol positif (+) ( $p<0,05$ )

d : berbeda signifikan terhadap kontrol negatif (-) ( $p<0,05$ )

**Tabel 4. Hasil pengujian aktivitas antibakteri susu fermentasi merek X dan Y terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan menggunakan sumuran**

Sampel	Waktu inkubasi	Diameter hambat (mm)			Rata-rata (mm) ± SD
		Replikasi			
		1	2	3	
Sampel X	24 Jam	10	9,5	10,5	10 ± 0,5 <sup>bcd</sup>
Sampel Y		10	9,5	9,5	9,66 ± 0,28 <sup>acd</sup>
Kontrol +		14	14,5	15	14,5 ± 0,5 <sup>abd</sup>
Kontrol -		0	0	0	0 ± 0 <sup>abc</sup>
Sampel X	48 Jam	10	9	9,5	9,5 ± 0,5 <sup>bcd</sup>
Sampel Y		9,5	9	9	9,16 ± 0,28 <sup>acd</sup>
Kontrol +		14	13,5	14	13,83 ± 0,28 <sup>abd</sup>
Kontrol -		0	0	0	0 ± 0 <sup>abc</sup>

Keterangan:

Kontrol + : Amoksisilin

- Kontrol - : Aquades  
 a : berbeda signifikan terhadap sampel X ( $p<0,05$ )  
 b : berbeda signifikan terhadap sampel Y ( $p<0,05$ )  
 c : berbeda signifikan terhadap kontrol positif (+) ( $p<0,05$ )  
 d : berbeda signifikan terhadap kontrol negatif (-) ( $p<0,05$ )

Berdasarkan hasil pada tabel 3 dan 4 menunjukkan adanya daya hambat yang terbentuk. Dibuktikan dengan daerah disekitar kertas cakram dan daerah sekitar sumuran yang tidak ditumbuhi bakteri, dari tabel di atas menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri susu fermentasi merek X dengan waktu inkubasi selama 24 jam mempunyai daya hambat pada kertas cakram paling besar terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan luas zona hambat sebesar 11,66 mm dibandingkan dengan susu fermentasi merek Y yang diinkubasi selama 24 jam dengan luas zona hambat hanya sebesar 11 mm, sedangkan pada metode sumuran senyawa antibakteri yang terdapat pada BAL dengan susu fermentasi merek X menunjukkan zona hambat sebesar 10 mm, dibandingkan dengan susu fermentasi merek Y pada perlakuan dengan waktu inkubasi selama 24 jam dengan luas zona hambat sebesar 9,66 mm.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada metode difusi dengan kertas cakram mempunyai hasil yang lebih baik dilihat dari zona hambat yang terbentuk dibandingkan dengan zona hambat yang terbentuk pada sumuran, hal ini disebabkan karena disebabkan beberapa faktor seperti zat atau jumlah antibakteri yang tersedia pada kertas cakram dan sumuran yang berbeda. Pada kertas cakram direndam kedalam cawan petri yang berisi senyawa antibakteri, sehingga pada kertas cakram senyawa antibakteri yang dihasilkan BAL bisa terserap kedalam kertas cakram, dan pada kertas cakram senyawa antibakteri dari BAL masih bisa menyimpan nutrisi untuk bertahan hidup, sedangkan pada sumuran senyawa antibakteri di pipet terlebih dahulu sebelum dimasukkan kedalam sumur yang telah dibentuk, sehingga menyebabkan kandungan dalam senyawa antibakteri dari BAL tidak bisa berdifusi secara menyeluruh. Sehingga mempengaruhi kerja dari senyawa antibakteri dari BAL untuk bertahan dalam cawan petri yang berisi media MHA, dan mempengaruhi zona hambat yang terbentuk.

Inkubasi selama 48 jam terlihat zona hambat pada kertas cakram atau sumuran mengalami penurunan dibandingkan dengan perlakuan inkubasi selama 24 jam. Pada perlakuan dengan lama waktu inkubasi selama 24 jam dan 48 jam dapat menyebabkan perbedaan kekuatan pada aktivitas antibakteri.

Perbedaan diameter zona hambat dikarenakan adanya pertumbuhan bakteri uji, dimana pada inkubasi selama 24 jam bakteri uji belum tumbuh secara maksimal. Sedangkan pada inkubasi selama 48 jam bakteri sudah tumbuh secara maksimal, sehingga menyebabkan zona hambat yang terbentuk mengalami penurunan aktivitasnya, dilihat dari diameter zona hambat yang terjadi. Kematian jumlah sel dipengaruhi oleh pH, nutrisi, dan konsentrasi substrat. Menurut Hudaya dan Darajad (1980) mengatakan bahwa keadaan yang dapat mempengaruhi aktivitas pertumbuhan mikroorganisme antara lain pH, dan konsentrasi substrat. Pertumbuhan bakteri biasanya dibatasi oleh ketersediaan nutrisi seperti karbon organik, nitrogen dan fosfor (Peterson *et al*, 2005).

Menurut Djide dan Sartini (2008), umumnya bakteri asam laktat menghasilkan senyawa metabolit primer seperti asam laktat, asam asetat, hidrogen peroksida dan bakteriosin berfungsi sebagai antibakteri. Menurut Sarkono *et al.*, (2006), Giraud *et al.*, (2004) dalam Harmayani *et al.*,(2009), bakteri asam laktat memproduksi metabolit primer pada akhir fase logaritmik jam ke-18 sampai jam ke-24. Yuliana (2007), menyatakan bahwa untuk bakteri asam laktat fase logaritmik biasanya dicapai pada inkubasi 18-24 jam tergantung media dan jenis BAL.

Yang (2000) menyatakan bahwa, fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat ditandai dengan peningkatan jumlah asam-asam organik yang diiringi dengan penurunan pH. Ditambahkan pula oleh pendapat Malaka (2010) yang menyatakan bahwa peningkatan asam laktat diakibatkan oleh aktivitas bakteri, pH akan menurun, akibat aktivitas buffer fosfat, sitrat dan protein.

Adesokan *et al.* (2011) melaporkan bahwa peningkatan kadar asam dan penurunan pH pada fermentasi susu dengan kultur bakteri asam laktat sudah terlihat selama 24 jam. Semakin banyak jumlah mikroba yang berkembang biak maka kemampuan menghasilkan asam laktat juga meningkat. Rahman (1992),

menambahkan asam laktat yang terbentuk akan menyebabkan penurunan nilai pH. Namun peningkatan aktivitas antibakteri secara signifikan oleh BAL tidak terlihat pada inkubasi selama 48 jam. Menurut Syahniar (2009) penurunan pH BAL disebabkan oleh adanya asam-asam organik yang terbentuk selama pertumbuhan sebagai metabolit primer dari bakteri tersebut. BAL dapat menghasilkan metabolit yang bersifat antimikroba antara lain: asam laktat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin (Mourod *et al.*, 2005).

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. Hal ini juga diperkuat oleh 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 >20 mm).

Zona hambat yang didapatkan dari aktivitas antibakteri dalam susu fermentasi merek X pada metode menggunakan kertas cakram dengan waktu inkubasi selama 24 jam sebesar 11,66 mm dan pada susu fermentasi merek Y dengan kertas cakram dengan waktu inkubasi 24 jam didapatkan zona hambat sebesar 11 mm, dengan diameter tersebut tergolong kuat (zona hambat 10-20 mm). Sedangkan pada metode sumuran diameter zona hambat yang terbentuk dari susu fermentasi merek X sebesar 10 mm, dan susu fermentasi merek Y sebesar 9,66 mm yang masing-masing diinkubasi selama 24 jam termasuk dalam golongan sedang. Aquades digunakan sebagai kontrol negatif, sehingga pelarut tersebut tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri artinya, aquadest tersebut tidak memiliki zona hambat pada media tersebut. Amoksisilin sebagai kontrol positif memiliki diameter zona hambat yang paling besar dibandingkan dengan

senyawa antibakteri yang dihasilkan dari susu fermentasi merek X dan Y. Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada lampiran 9.

Uji statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan (susu fermentasi merek X dan Y), kelompok kontrol positif, dan kelompok kontrol negatif. Perbedaan pada semua kelompok terjadi pada pengujian dengan menggunakan kertas cakram yang diinkubasi selama 24 jam dengan nilai signifikansi 0,000 ( $p<0,05$ ) serta inkubasi selama 48 jam dengan nilai signifikansi 0,020 ( $p<0,05$ ). Metode sumuran menunjukkan diameter zona hambat berbeda bermakna pada semua kelompok dengan nilai signifikansi 0,000 ( $p<0,05$ ) dengan waktu inkubasi 24 jam, serta pada inkubasi 48 memiliki nilai signifikansi sebesar 0,016 ( $p<0,05$ ). Hasil data analisis dapat dilihat pada lampiran 12.

Perbandingan waktu inkubasi antara waktu 24 jam dan 48 jam diuji secara statistik. Hasil uji menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna diameter zona hambat antara kelompok yang diinkubasi selama 24 jam dengan kelompok yang diinkubasi selama 48 jam dengan hasil signifikansi sebesar 0,546 ( $p>0,05$ ).

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa:

Pertama, produk susu fermentasi merek X dan Y memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, aktivitas antibakteri yang lebih aktif terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah susu fermentasi merek X.

#### **B. Saran**

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

Pertama, untuk penelitian lebih lanjut dengan menggunakan seri pengenceran pada susu fermentasi merek X dan Y.

Kedua, penelitian lebih lanjut tentang indentifikasi secara spesifik bakteri asam laktat (BAL) pada susu fermentasi merek X dan Y.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdurahman D. 2008. *Biologi Kelompok Pertanian*, PT. Grafindo Media Pratama, Jakarta.
- Adesokan I.A., B.B. Odetoyinbo, Y.A. Ekanola, R.E. Avanrenren and S.Fakorede. 2011. Production of Nigerian nono using lactic *starter* cultures. *Pakistan J. Nutr.* 10(3): 203-207.
- Adriani, L. 2005. Bakteri probiotik sebagai *starter* dan implikasi efeknya terhadap kualitas yoghurt, ekosistem saluran pencernaan dan biokimia darah mencit. *Disertasi*, ProGram Pasca Sarjana. Universitas Padjajaran: Bandung.
- Adriani, L. 2010. Yoghurt Sebagai Probiotik, Dalam Soeharsono (eds). *Probiotik*. Bandung: Widya Padjadjaran.
- Alcamo, 1997, *Fundamentals of Microbiology*, Fifth Edition, Cummings Publishing Company, USA, 732-733
- Ajizah A. 2004. *Sensitivitas Salmonella typhimurium Terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava L.* *Jurnal Biologi Pertanian* 1:31-8.
- Alakomi, H.L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K and Helander,I.M. 2000. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting Outer Membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No.5., 2001-2005.
- Atlas, R.M., 1997, *Principles of Microbiology*, Second Edition, WMC Brown Publisher, Iowa, 238.
- Aquina A.R. 2007. Uji Potensi Antibakteri Senyawa Yang Dihasilkan Bakteri Dalam Susu Fermentasi Yakult<sup>®</sup> Terhadap *Escherichia coli* DAN *Enterococcus faecalis* [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma.
- Bonang G, dan Koeswardono. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: PT Gramedia. Hlm. 77-78, 136, 176-191.
- Boyd, R. F., 1984, *General Microbiology*, Mosby College Publishing, Missouri, 120.
- Buckle, K.A., et al. 1987. *Ilmu Pangan*. Diterjemahkan oleh Purnomo, Hari dan Adiono. Jakarta: Universitas Indonesia Press.

- Buckle, K.A., Edwards, R.A., Fleet, G.H., and Wootton, M., 2007. *Ilmu Pangan*. Penerjemah: Hari Purnomo dan Adiono, Universitas Indonesia, Jakarta
- Cielsa WP, Guerrant RI, 2003. *Infectious Diarrhea*. In: Wilson WR, Drew WL, Henry NK, et al., ed.
- Daeschel, M.A., 1989, *Antimicrobial Substances From Lactic Acid Bacteria For Uses as Food Preservatives*, *Journal of Food Technology*, **43**, 148-155, 164- 167.
- Darmandi. 2008. Infeksi Nosokomial : Problematika Dan Pengendaliannya . Jakarta : Penerbit Salemba Medika
- Davidson, P.M., and Parish, M.E., 1989, Methods For Testing The Efficacy of Food Antimicrobial, *Journal of Food Technology*, 148-155.
- Djide dan Sartini. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi Farmasi*. Makasar: Lephas.
- Dorland, Newman. 2002. *Kamus Kedokteran Dorland*. Edisi 29, Jakarta : EGC, 1765.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M. & Prevost, H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 564–582
- Felley, C and Michetti P. 2003. Probiotics and Helicobacter pylori. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.17(5):785-91.
- Fardiaz, S., 1992, *Mikrobiologi Pangan I*, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 62- 64.
- Frazier, W.C., and Westhoff, D.C., 1988, *Food Microbiology*, Fourth Edition, McGraw-Hill Book Company, New York, 14-15.
- Gillespie, Stephen dan Kathleen Bamford. 2008. *At a Glance Mikrobiologi Medis dan Infeksi Edisi Ketiga*. Jakarta: Erlangga.
- Gilman, A.G., 2007. *Goodman & Gilman Dasar Farmakologi Terapi*, diterjemahkan oleh Tim Alih Bahasa Sekolah Farmasi ITB, Edisi X, 877, Penerbit Buku Kedokteran, EGC, Jakarta.
- Hudaya, S. dan S. Daradjat. 1980. *Dasar-Dasar Pengawetan I*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Jakarta.
- Harian Republika. 2006. “Lebih Jauh dengan Yoghurt”. [www.Republika\\_online.go.id](http://www.Republika_online.go.id) : 20 Agustus 2006.

- Harmayani E, Endang SR, Titiek FD, Citra AS, Marwati T. 2009. Pemanfaatan kultur *Pediococcus acidilactici* F-11 penghasil bakteriosin sebagai penggumpal pada pembuatan tahu. *J Pascapanen*. 6(1) : 1020.
- Harminta. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya, majalah Ilmu Kefarmasian, Vol I, No.3. Departemen Farmasi FMIPA-UI: Jakarta
- Haryani, A. 2012. *Uji Efektifitas Daun Pepaya (Carica papaya) untuk pengobatan Infeksi Bakteri Aeromonas hydrophila Pada Ikan Mas Koki (Carassius auratus)*. Skripsi. Program Studi Sarjana Perikanan. Universitas Padjadjaran.
- Hermawan A. 2007. Pengaruh Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan Metode Difusi Disk. *Article ilmiah*, Universitas Airlangga.
- Holt. J.G., et al. 2000. Bergey's Manual Determinative Bacteriology. Baltimore: Williamn and Wilkins Baltimore
- Irianto, K. 2013. Mikrobiologi Medis. Bandung: Alfabeta.
- Jawetz E. Melnick JL. Adelberg FA. 1986. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*, Edisi XVII, 368-384
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran*. Ed-23. Nani W, Penerjemah; jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG. Terjemahan dari: *Medical Microbiology*. Hal 170.
- Jawetz, Melnick, J.L., and Adelberg,E.A., 2012. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 25. Editor edisi bahasa Adisti adityaputri et al, Jakarta : EGC
- Jawetz E. Melnick JL. Adelberg FA. 2013. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 25. Nugroho A W et al, penerjemah; Adityaputri A et al, Editor. Jakarta: EGC. Terjemahan dari: *Medical Microbiology*
- Jutono, S., J, Hartadi, S. Kabirun, D. Suhadi, dan Soesanto. 1980. Pedoman praktikum mikrobiologi umum. Fakultas Pertanian UGM. Yogyakarta. 181 p.
- Kaplan, H. and Hutkins, R.W. 2000. Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifi dobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 6., 26822684.
- Kayser, FH. *Medical Microbiology*. New York: Thieme Stuttgart. 2005. Halaman. 295-187
- Klaenhammer, T. R. and Kullen, M. J. 1999. Selection and design of probiotics.

- Int. J. Food Microbiol. 50: 4557
- Kusmayati, Agustini NWR. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga (*Porphyridium cruentinum*). *Biodiversitas* 8:48-53.
- Kusumaningsih A. 2010. Beberapa Bakteri Patogenik Penyebab Foodborne Disease Pada Bahan Pangan Asal Ternak. *Wartazoa* 20:103-111.
- Lay, W. B. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Madigan, M.T, 2003, *Brock Biology of Microorganism*, Pearson Education : inc. United State of America.
- Maksum R. 2002. *Buku Ajar Mikrobiologi*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hlm: 125-129.
- Malaka & Sulmiyati. 2010. Karakteristik Fisik dan Organoleptik keju Markisa Dengan Pemberian Level Starter (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 527) Dengan Lama Pemeraman Yang Berbeda. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*, Makassar
- Mourad, K.; Halima, Z.K, and Nour-Eddine, K., 2005, Detection and Actifity of Plantaricin OL 15 a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus Plantarum* OL 15 Isolated from Algerian Fermented Olive, *Grasas y Aceites* 56 (3): 192-197.
- Melliawati, R. 2009. *E. coli* dalam kehidupan manusia. Bio trends/Vol.4/No.1/Th. 2009
- Nester, E.W., Anderson, G., Roberts Jr, C.E., Pearsall, N.N., and Nester, M.T., 2001, *Microbiology a Human Perspective*, Third (3<sup>rd</sup>) Ed, McGraw Hill, New York, 603, 805, 636.
- Odianti G. 2010. *Uji aktivitas antibakteri alfa mangostin kulit buah manggis (Garcinia mangostana L.) terhadap Staphylococcus aureus dan Pseudomonas aeruginosa multiresisten antibiotik*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah.
- Pelczar, Michael J dan Chan, E. C. S. 1998. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid II*. Jakarta: UI Press.
- Poeloengan M, Praptiwi P. 2012. Uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana Linn*). *Media Litbang Kesehatan.*; 20(2). h.65-9.

- Prangdimurti, E., 2006, *Probiotik dan Efek Perlindungannya Terhadap Kanker Kolon*, 11 pages, Available from URL : [http://www.tumoutou.net/3\\_sem1\\_012/endang](http://www.tumoutou.net/3_sem1_012/endang).
- Procop GW, Cockerill F. 2003. *Enteritis Caused by Escherichia coli and Shigella and Salmonella Species*. Di dalam: Wilson WR, Drew WL, Henry NK, et al, Editors. *Current Diagnosis and Treatment in Infection Disease*. New York: Lange Medeical Books. hlm 584-600.
- Purwijantiningsih, E. 2011. Daya anti bakteri yogurt sinbiotik terhadap beberapa bakteri patogen enterik. *Biota*, 16 (2): 173 177.
- Radji M, 2010. *Mikrobiologi*. Jakarta: Buku Kedokteran ECG. Hal: 29-32, 68, 125, 127-129.
- Radji M, 2011. *Mikrobiologi*. Buku Kedokteran ECG, Jakarta.
- Rahman, 1992. Teknologi Fermentasi. Penerbit Arcan, Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, IPB, Bogor
- Rostinawati T. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa L.*). Terhadap *Escherichia Coli*, *Salmonella Thyphi*, Dan *Staphylococcus Aureus* Dengan Metode Difusi Agar. Fakultas Farmasi, Universitas Padjajaran.
- Ruzana. 2011. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Antibakteri dari Feses Bayi. [Tesis]. Malang: Universitas Brawijaya
- Sarkono, Sembiring L, Rahayu ES. 2006. Isolasi, seleksi, karakterisasi dan identifikasi bakteri asam laktat (BAL) penghasil bakteriosin dari berbagai buah masak. *Sains dan Sibernatika* 19 (2):1-5.
- Shah, N.P.1999. Probiotic Bacteria : Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal Dairy Sci.* 83 : 894-907.
- Singleton and Sainsbury, 2001, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, Third Edition, John Wiley Sons Ltd, UK, 300, 424-426, 482-483.
- Siswandono dan Soekardjo B. 2008. *Kimia Medisinal*. Airlangga University Press. Hlm: 128.
- Suarsana, N.I., Suarini, A.G., Utama, H.I. 2004. Pengaruh Yoghurt Terhadap Kadar Kolesterol Total dan Profil Lipoprotein Serum Kelinci. *Journal Veterine.*,5: 12-14.
- Sukandar Elin Y., et al,. 2013. ISO *Farmakoterapi Buku 1*. Jakarta: ISFI penerbitan. Hlm. 741-743.

- Supardi, dan Sukamto. 1999. Mikrobiologi Dalam Pengolahan Dan Keamanan Produk Pangan. Bandung : Penerbit Alumni.
- Surajudin, Kusuma, F.R., Purnomo, Dwi. 2006. Yoghurt, Susu Fermentasi yang Menyehatkan. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Suriwiria, U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Papas Sinar Sinanti.
- Suseno, T.I.P., Surjoseputro, S. dan Anita, K. 2000. Minuman Probiotik Nira Siwalan: Kajian Lama Penyimpanan terhadap Daya Anti Mikroba *Lactobacillus casei* pada beberapa Bakteri Patogen. *J. Teknologi Pangan dan Gizi*, 1 (1): 1 13
- Suyati, 2010, Identifikasi dan Uji Antibiotik Bakteri Gram Negatif pada Sampel Urin Penderita Infeksi Saluran Kemih (ISK), *Skripsi*, Universitas Negeri Papua Manokwari.
- Syahniar, T., 2009, Produksi dan Karakterisasi Bakteriosin Asal *Lactobacillus plantarum* 1A5 Serta Aktivitas Antimikrobanya Terhadap Bakteri Patogen. Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, ITB, Bogor (Skripsi).
- Tarigan, J., 1988, *Pengantar Mikrobiologi*, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Jakarta, 310-321.
- Tjay dan Raharja. 2002. *Obat-obat Penting*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- Urnemi, S. Syukur, E. Purwati, I. Sanusi, Jamsari. 2012. Potensi bakteri asam laktat sebagai kandidat probiotik penghasil bakteriosin terhadap mikroba patogen asal fermentasi kakao varietas Criollo. *Jurnal Riset teknologi Industri* (LIPI). 6 (13).
- Volk, W. and M.F. Wheeler. 1998. Basic microbiology (Mikrobiologi dasar diterjemahkan oleh Markhan). Erlangga. Jakarta:301-303.
- Waluyo L. 2004. *Mikrobiologi Dasar*. Universitas Muhammadiyah Malang, Hal: 63.
- Wardani, K.A., 2008. *Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Residu Ekstrak Etanolik Daun Arbenan (Duchesnea indica (Andr.) Focke.) Terhadap Staphylococcus aureus dan Pseudomonas aeruginosa. Multi Resisten Antibiotika Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis*. Skripsi Fak. Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Wibowo, W. 2002. Bioteknologi Fermentasi Susu. Pusat Pengembangan Bioteknologi. Universitas Muhammadiyah Malang.

- Widyarto A, N. 2009. UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI DAUN JERUK KEPROK (*Citrus nobilis Lour.*) TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*. Skripsi. Fak. Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Yang, Z. 2000. *Antimicrobial Compunds and Extracellular Polysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria : Structures and Properties*. Disertasi. Departement of Food Technology. University of Helsinki
- Yuliana, N. 2007. Kajian Agensia Bioteknologi, Bakteri Asam Laktat, Sebagai Starter untuk Produksi Tempoyak. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi 2007. Univeristas Lampung, 27-28 Agustus 2007.

L

A

M

P

I

R

A

N

## Lampiran 1. Daftar Komposisi Media MRS (Man Rogosa Sharpe) Agar

### Culture Media

**Enteric Pathogens, Central Public Health Laboratory, Colindale, London. Dr. B. Rowe, Personal Communication, 1988.**

#### Technique

- 1 Inoculate three drops (ca. 0.1ml) of the pre-enrichment culture (after incubation for 16–20 hours) in separate spots on the surface of the MSR Medium plates.
- 2 Incubate the plates in an upright position at 42°C for up to 24 hours. (Care should be taken not to exceed 24 hours.)
- 3 Examine the plates for motile bacteria which will be shown by a halo of growth originating from the inoculation spot.
- 4 Sub-cultures can be taken from the outside edge of the halo to confirm purity and for further biochemical and serological tests.

De Smedt<sup>6</sup> reported that if MSR medium is contained in test tubes and incubation is carried out under anaerobic conditions, visible migration zones are produced in 6 hours enabling *Salmonella* in foods to be detected in 24 hours.

#### Storage conditions and Shelf life

Store the dehydrated medium below 25°C and use before the expiry date on the label.

Store the selective supplement in the dark at 2°C to 8°C and use before the expiry date on the label.

The prepared medium may be stored for up to 2 weeks at 2°C to 8°C in the dark.

#### Quality Control

##### Positive control:

*Salmonella typhimurium* ATCC<sup>®</sup> 14028 – Straw colonies at site of inoculation surrounded by halo of growth.

*Salmonella enteritidis* ATCC<sup>®</sup> 13076 – Straw colonies at site of inoculation surrounded by halo of growth.

##### Negative control:

*Citrobacter freundii* ATCC<sup>®</sup> 8090 – Restricted or no growth.

#### Precautions

The basal medium is very hygroscopic. When handling the powder a face mask and gloves must be worn.

#### References

- 1 De Smedt J. M., Bolderdijk R., Rappold H. and Lautenschlaeger D. (1980) *J. Food Prot.* 49: 510–514.
- 2 De Smedt J. M., Bolderdijk R. (1987) *J. Food Prot.* 50: 658–661.
- 3 De Zutter L. et al. (1991) *Int. J. Food Micro.* 13: 11–20.
- 4 De Smedt J. M. et al. (1991) *Int. J. Food Micro.* 13: 301–308.
- 5 Holbrook R., Anderson J. M., Baird-Parker A. C., Dodds L. M., Sawhney D., Strachan S. H. and Swaine D. (1989) *Lett. Appl. Microbiol.* 9: 139–142.
- 6 De Smedt, J. M. (1998) *Abstract 1.5, Int. Symposium - Foodborne Pathogens: Detection and Typing*, The Hague, The Netherlands, 20th–21st April 1998.

### MRS AGAR

#### (DE MAN, ROGOSA, SHARPE)

Code: CM361

*A solidified version of MRS Broth for the culture of lactic acid bacteria.*

Formula	gm/litre
Peptone	10.0
'Lab-Lemco' powder	8.0
Yeast extract	4.0
Glucose	20.0
Sorbitan mono-oleate	1ml
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0
Sodium acetate 3H <sub>2</sub> O	5.0
Triammonium citrate	2.0
Magnesium sulphate 7H <sub>2</sub> O	0.2
Manganese sulphate 4H <sub>2</sub> O	0.05
Agar	10.0
pH 6.2 ± 0.2	

#### Directions

Suspend 62 grams in 1 litre of distilled water. Boil to dissolve the medium completely. Dispense into tubes, bottles or flasks and sterilise by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

#### Description

The MRS formulation was developed by de Man, Rogosa and Sharpe<sup>1</sup> to replace a variable product (tomato juice) and at the same time to provide a medium which would support good growth of lactobacilli in general, even those strains which showed poor growth in existing media.

MRS medium is superior to the tomato juice medium of Briggs<sup>2</sup> and the meat extract tomato juice medium of de Man. It gives more profuse growth of all strains of lactobacilli, especially the difficult and slow growing strains of *L. brevis* and *L. fermenti*.

MRS Agar and Broth were designed to encourage the growth of the 'lactic acid bacteria' which includes species of the following genera: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc*. All these species can produce lactic acid in considerable amounts. They are Gram +ve, catalase and oxidase -ve and are fastidious in their nutritional requirements. Growth is enhanced considerably by micro aerophilic conditions.

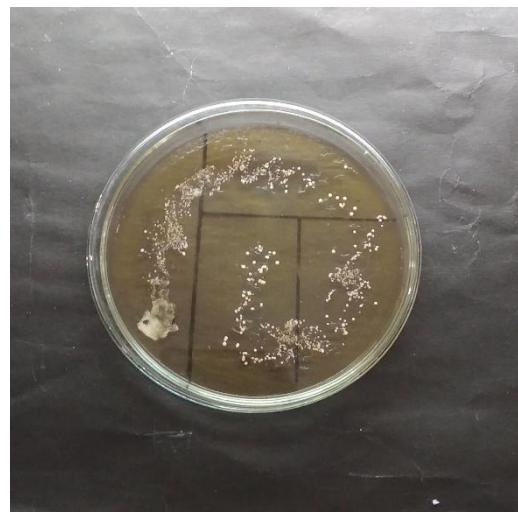
Generally the 'lactic acid bacteria' show delayed growth and smaller colony size than other micro-organisms. They may be overgrown in non-selective media, especially if incubation is required for 2–4 days.

Selection can be made by pH adjustment, thus lactobacilli will tolerate lower pH levels than streptococci (pH 5.0–6.5) with pediococci and leuconostocs growing best within this range. Inhibitors of the main groups of competitor microflora include thallous acetate, sodium acetate, sorbic acid, acetic acid, sodium nitrite, cycloheximide and polymyxin. These substances can be used at varying concentrations and combinations but inevitably a compromise has to be reached between selectivity and productivity of the organism sought<sup>3</sup>.

**Lampiran 2. Hasil Morfologi Koloni Isolat Bakteri dari Susu Fermentasi merek X dan Y dalam media MRSA**



Susu fermentasi merek X

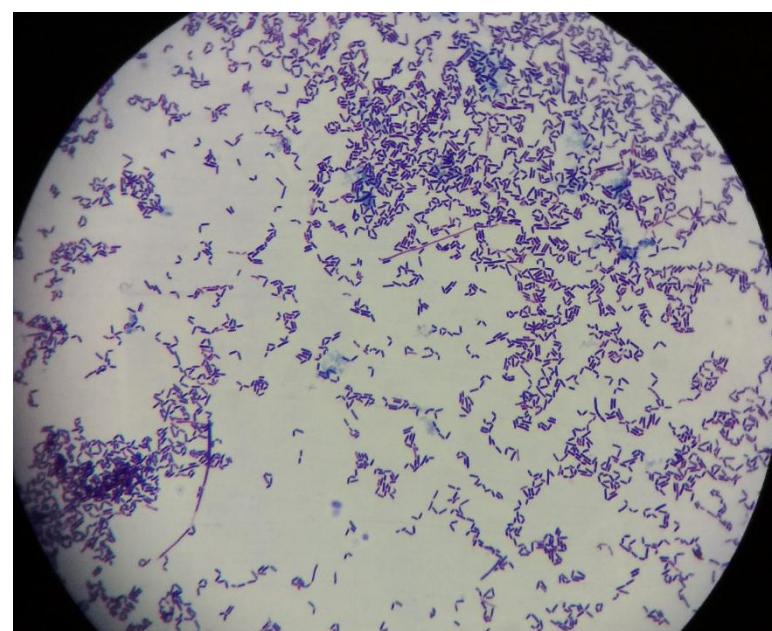


Yoghurt merek Y

**Lampiran 3. Gambar hasil identifikasi mikroskopis BAL dalam susu fermentasi merek X dan Y dengan pewarnaan gram**

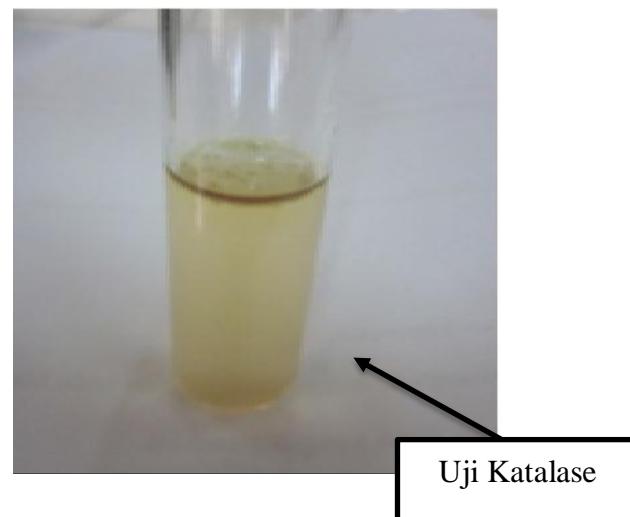
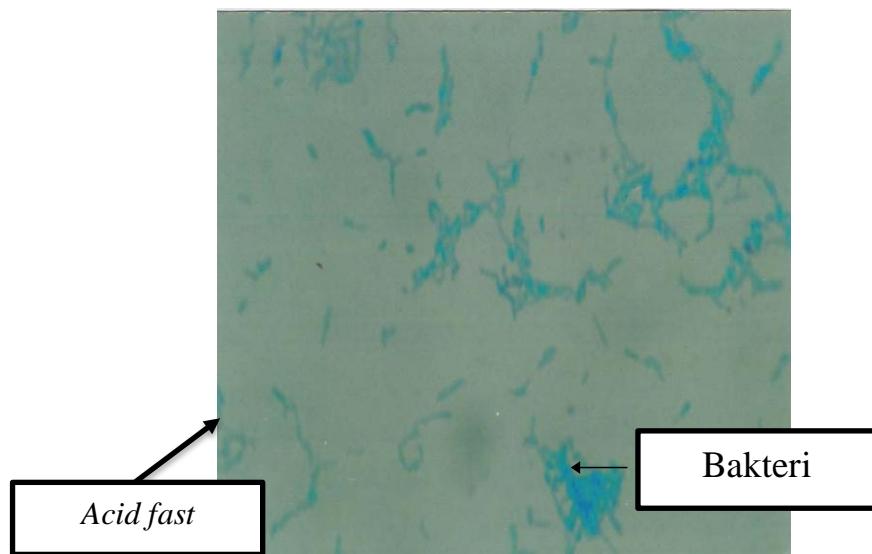


Susu fermentasi merek X

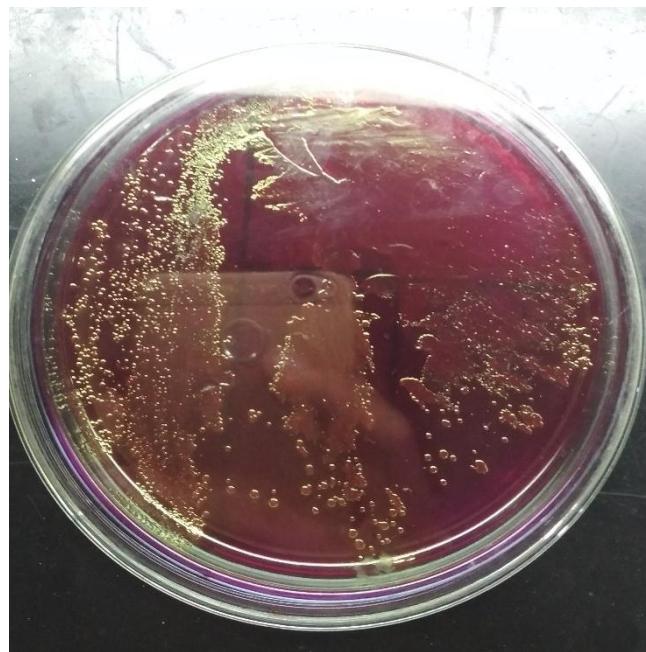


Yoghurt merek Y

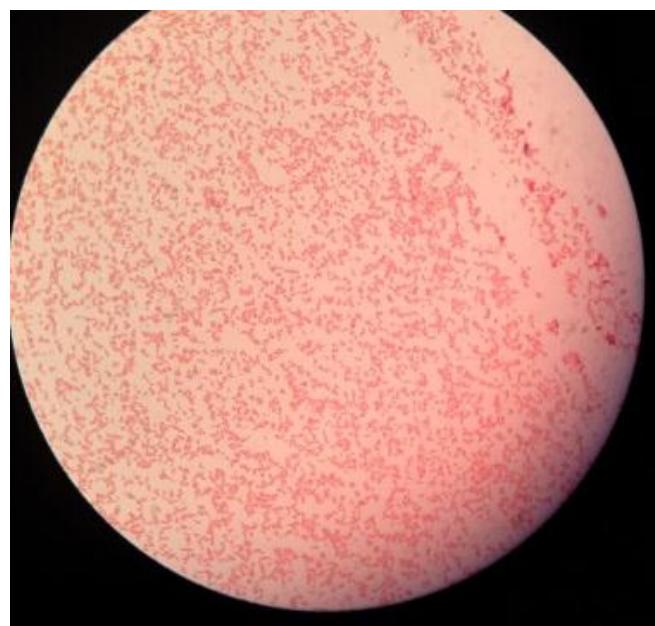
**Lampiran 4.** Gambar hasil mikroskopis dengan pewarnaan *acid fast* dan uji katalasae pada bakteri BAL



**Lampiran 5. Gambar hasil identifikasi makroskopis bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media *Endo Agar* (EA)**

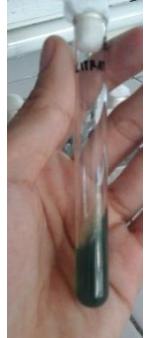


**Lampiran 6. Gambar hasil identifikasi mikroskopis bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan gram**

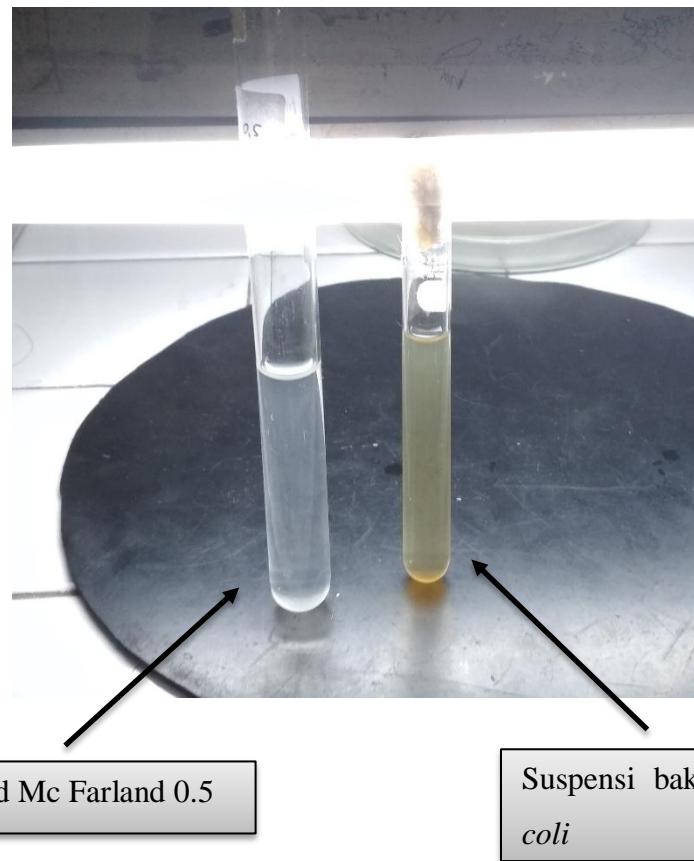


### Lampiran 7. Hasil Uji Biokimia

No	Jenis Bakteri	Medium	Gambar	Hasil	Keterangan
1	<i>E. Coli</i>	SIM		Sulfida : ( - ) Indol : ( + ) Motilitas : ( + )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uji sulfida : uji positif jika pada media terbentuk warna hitam</li> <li>• Uji indol : media ditambahkan reagen Erlich A (3tetes) dan Erlich B (3tetes), jika terbentuk indol maka akan terbentuk warna merah.</li> <li>• Uji motilitas : uji positif jika terjadi pertumbuhan pada seluruh media dan uji negatif jika ada pertumbuhan hanya di bekas inokulas (seraput-seraput berwarna putih)</li> </ul>
		KIA		A/A <sup>S-</sup> <sub>G+</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bagian lereng : jika berwarna merah maka ditulis K</li> <li>• Bagian dasar : jika berwarna kuning maka ditulis A</li> <li>• Adanya gas : jika media pecah atau terangkat keatas maka ditulis G+, jika media tetap maka ditulis G-</li> <li>• Sulfida : jika media berwarna hitam maka ditulis S+, jika media tidak terbentuk warna hitam maka ditulis S-</li> </ul>

No	Jenis Bakteri	Medium	Gambar	Hasil	Keterangan
		LIA		K/K <sup>S-</sup> <sub>G-</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bagian lereng : jika berwarna merah maka ditulis K</li> <li>• Bagian dasar : jika berwarna kuning maka ditulis A</li> <li>• Adanya gas : jika media pecah atau terangkat keatas maka ditulis G+ , jika media tetap maka ditulis G-</li> <li>• Sulfida : jika media berwarna hitam maka ditulis S+, jika media tidak terbentuk warna hitam maka ditulis S-</li> </ul>
		CITRAT		-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uji positif : jika media berwarna biru</li> </ul>

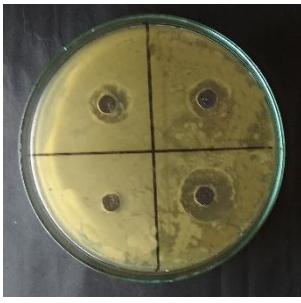
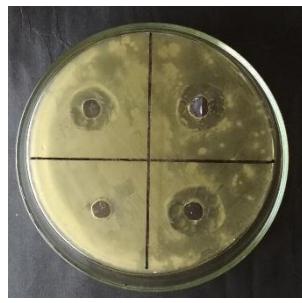
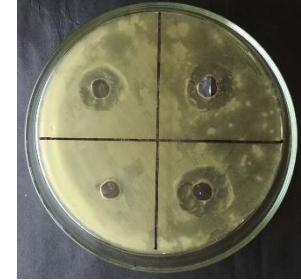
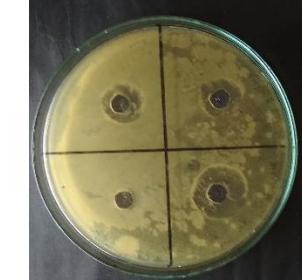
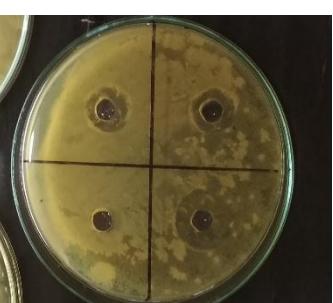
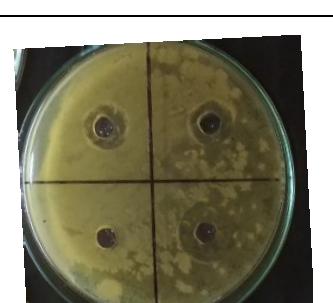
**Lampiran 8. Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media BHI**



**Lampiran 9. Foto hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi  
KERTAS CAKRAM**

Sampel	Gambar		
	1	2	3
Sampel X 24 jam			
Sampel X 48 jam			
Sampel Y 24 jam			
Sampel Y 48 jam			

**SUMURAN**

<b>Sampel</b>	<b>Gambar</b>		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Sampel X</b> <b>24 jam</b>			
<b>Sampel X</b> <b>48 jam</b>			
<b>Sampel Y</b> <b>24 jam</b>			
<b>Sampel Y</b> <b>48 jam</b>			

**Lampiran 10. Sampel susu fermentasi****Susu fermentasi merek X****Yoghurt merek Y**

**Lampiran 11. Foto alat**

**Keterangan :**

**A : Oven**

**B ; Autoklaf**

**C ; Inkubator**

**Foto alat****A****B****C****D****Keterangan :****A : Inkas****B : Vortex****C : Timbangan analitik****D : Sentrifuge**

## Lampiran 12. Hasil analisis statistik

### KERTAS CAKRAM INKUBASI 24 JAM One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter zona hambat
N		12
Normal Parameters <sup>a,,b</sup>	Mean	9.4167
	Std. Deviation	5.90005
Most Extreme Differences	Absolute	.323
	Positive	.195
	Negative	-.323
Kolmogorov-Smirnov Z		1.118
Asymp. Sig. (2-tailed)		.164

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

#### Test of Homogeneity of Variances

Diameter zona hambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.600	3	8	.065

#### ANOVA

Diameter zona hambat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	382.250	3	127.417	1529.000	.000
Within Groups	.667	8	.083		
Total	382.917	11			

#### Multiple Comparisons

Diameter zona hambat  
LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Amoxicillin	Positif Kontrol Negatif Aquadest	15.00000	.23570	.000	14.4565	15.5435
	Kontrol perlakuan produk X	3.33333	.23570	.000	2.7898	3.8769
	Kontrol perlakuan produk Y	4.00000	.23570	.000	3.4565	4.5435
Kontrol Aquadest	Negatif Kontrol Positif Amoxicillin	-15.00000	.23570	.000	-15.5435	-14.4565
	Kontrol perlakuan produk X	-11.66667	.23570	.000	-12.2102	-11.1231
	Kontrol perlakuan produk Y	-11.00000	.23570	.000	-11.5435	-10.4565
Kontrol perlakuan produk X	Kontrol Positif Amoxicillin	-3.33333	.23570	.000	-3.8769	-2.7898
	Kontrol Negatif Aquadest	11.66667	.23570	.000	11.1231	12.2102
	Kontrol perlakuan produk Y	.66667	.23570	.022	.1231	1.2102
Kontrol perlakuan produk Y	Kontrol Positif Amoxicillin	-4.00000	.23570	.000	-4.5435	-3.4565
	Kontrol Negatif Aquadest	11.00000	.23570	.000	10.4565	11.5435
	Kontrol perlakuan produk X	-.66667	.23570	.022	-1.2102	-.1231

### Multiple Comparisons

Diameter zona hambat  
LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Amoxicillin	Positif Kontrol Negatif Aquadest	15.00000	.23570	.000	14.4565	15.5435
	Kontrol perlakuan produk X	3.33333	.23570	.000	2.7898	3.8769
	Kontrol perlakuan produk Y	4.00000	.23570	.000	3.4565	4.5435
Kontrol Aquadest	Negatif Kontrol Positif Amoxicillin	-15.00000	.23570	.000	-15.5435	-14.4565
	Kontrol perlakuan produk X	-11.66667	.23570	.000	-12.2102	-11.1231
	Kontrol perlakuan produk Y	-11.00000	.23570	.000	-11.5435	-10.4565
Kontrol perlakuan produk X	kontrol Positif Amoxicillin	-3.33333	.23570	.000	-3.8769	-2.7898
	Kontrol Negatif Aquadest	11.66667	.23570	.000	11.1231	12.2102
	Kontrol perlakuan produk Y	.66667	.23570	.022	.1231	1.2102
Kontrol perlakuan produk Y	Kontrol Positif Amoxicillin	-4.00000	.23570	.000	-4.5435	-3.4565
	Kontrol Negatif Aquadest	11.00000	.23570	.000	10.4565	11.5435
	Kontrol perlakuan produk X	-.66667	.23570	.022	-1.2102	-.1231

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## KERTAS CAKRAM INKUBASI 48 JAM

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter zona hambat
N		12
Normal Parameters <sup>a,,b</sup>	Mean	9.0000
	Std. Deviation	5.73664
Most Extreme Differences	Absolute	.319
	Positive	.192
	Negative	-.319
Kolmogorov-Smirnov Z		1.106
Asymp. Sig. (2-tailed)		.173

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

### Test of Homogeneity of Variances

Diameter zona hambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.533	3	8	.039

## Kruskal-Wallis Test

### Ranks

Kelompok		N	Mean Rank
Diameter zona hambat	Kontrol Positif Amoxicillin	3	11.00
	Kontrol Negatif Aquadest	3	2.00
	Kontrol perlakuan produk X	3	7.17
	Kontrol perlakuan produk Y	3	5.83
	Total	12	

### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Diameter zona hambat
Chi-Square	9.791
df	3
Asymp. Sig.	.020

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

## SUMURAN INKUBASI 24 JAM

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter zona hambat
N		12
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	8.5833
	Std. Deviation	5.56300
Most Extreme Differences	Absolute	.280
	Positive	.189
	Negative	-.280
Kolmogorov-Smirnov Z		.969
Asymp. Sig. (2-tailed)		.304

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

### Test of Homogeneity of Variances

Diameter zona hambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.182	3	8	.168

### ANOVA

Diameter zona hambat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	338.750	3	112.917	542.000	.000
Within Groups	1.667	8	.208		
Total	340.417	11			

### Multiple Comparisons

Diameter zona hambat

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Amoxicillin	Positif Kontrol Negatif Aquadest	14.50000	.37268	.000	13.6406	15.3594
	Kontrol perlakuan produk X	4.00000	.37268	.000	3.1406	4.8594
	Kontrol perlakuan produk Y	5.16667	.37268	.000	4.3073	6.0261
Aquadest	Negatif Kontrol Positif Amoxicillin	-14.50000	.37268	.000	-15.3594	-13.6406
	Kontrol perlakuan produk X	-10.50000	.37268	.000	-11.3594	-9.6406
	Kontrol perlakuan produk Y	-9.33333	.37268	.000	-10.1927	-8.4739
perlakuan produk X	Kontrol Positif Amoxicillin	-4.00000	.37268	.000	-4.8594	-3.1406
	Kontrol Negatif Aquadest	10.50000	.37268	.000	9.6406	11.3594
	Kontrol perlakuan produk Y	1.16667	.37268	.014	.3073	2.0261
perlakuan produk Y	Kontrol Positif Amoxicillin	-5.16667	.37268	.000	-6.0261	-4.3073
	Kontrol Negatif Aquadest	9.33333	.37268	.000	8.4739	10.1927
	Kontrol perlakuan produk X	-1.16667	.37268	.014	-2.0261	-.3073

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## SUMURAN INKUBASI 48 JAM

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter zona hambat
N		12
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	8.7083
	Std. Deviation	5.52457
Most Extreme Differences	Absolute	.307
	Positive	.193
	Negative	-.307
Kolmogorov-Smirnov Z		1.063
Asymp. Sig. (2-tailed)		.208

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

### Test of Homogeneity of Variances

Diameter zona hambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.533	3	8	.039

## Kruskal-Wallis Test

### Ranks

Kelompok		N	Mean Rank
Diameter zona hambat	Kontrol Positif Amoxicillin	3	11.00
	Kontrol Negatif Aquadest	3	2.00
	Kontrol perlakuan produk X	3	7.67
	Kontrol perlakuan produk Y	3	5.33
	Total	12	

### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Diameter zona hambat
Chi-Square	10.298
df	3
Asymp. Sig.	.016

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

## PERBANDINGAN WAKTU 24 JAM DAN 48 JAM

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Diameter zona hambat
N		48
Normal Parameters <sup>a,,b</sup>	Mean	8.7604
	Std. Deviation	5.45386
Most Extreme Differences	Absolute	.268
	Positive	.196
	Negative	-.268
Kolmogorov-Smirnov Z		1.853
Asymp. Sig. (2-tailed)		.002

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## Kruskal-Wallis Test

**Ranks**

	Waktu	N	Mean Rank
Diameter zona hambat	24 jam	24	25.71
	48 jam	24	23.29
	Total	48	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Diameter zona hambat
Chi-Square	.365
df	1
Asymp. Sig.	.546

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Waktu

### Lampiran 13. Komposisi dan pembuatan media

#### 1. *Brain Heart Infusion* (BHI)

Komposisi : Sari otak anak sapi	12 Gram
Sari jantung sapi	5 Gram
Proteose peptone	10 Gram
Bacto dextrose	2 Gram
NaCl	5 Gram
Dinatrium fosfor	2,5 Gram
Bacto agar	15 Gram
Aquadest	ad1 L pH = 7,4

Cara pembuatan : Reagen-reagen di atas diarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

#### 2. *Endo Agar* (EA)

Komposisi : Pepton from meat	10 Gram
Laktosa	10 Gram
Di potassium hidrogen fosfat	3,5 Gram
Sodium sulfit	2,5 Gram
Fuchsin	0,4 Gram
Agar-agar	2,5 Gram
Air steril	ad 1000 ml

Cara pembuatan : Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

#### 3. *Sulfida Indol Motility* (SIM)

Komposisi : Pepton from casein	20 Gram
Pepton from meat	6 Gram
Ammonium Iron (II) citrate	0,2 Gram
Sodium thiosulfate	0,2 Gram
Aquade	ad 1000 ml

Cara pembuatan : Bahan-bahan diatas dilarutkan kedalam aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian sterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

#### 4. *Klinger Iron Agar* (KIA)

Komposisi :	Pepton from casein	15 Gram
	Pepton from meat	5 Gram
	Ammonium Iron (II) citrate	0,5 Gram
	Maet extract	3 Gram
	Yeast extract	3 Gram
	Sodium chloride	5 Gram
	Laktosa	10 Gram
	Glukosa	1 Gram
	Sodium thiosulfate	0,5 Gram
	Phenol red	0,024 Gram
	Agar-agar	12 Gram
	Aquadest	ad 1000 ml

Cara pembuatan : Bahan-bahan diatas dilarutkan kedalam Aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

#### 5. *Lysine Iron Agar* (LIA)

Komposisi :	Pepton from casein	5 Gram
	Yeast extract	3 Gram
	Glukosa	1 Gram
	Lysine monohidrochlorid	10 Gram
	Sodium thiosulfate	0,04 Gram
	Ammonium Iron (II) citrate	0,5 Gram
	Bromo cresol purple	0,02 Gram
	Agar-agar	12,5 Gram
	Aquadest	ad 1000 ml

Cara pembuatan : Bahan-bahan diatas dilarutkan kedalam Aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

#### 6. Citrat Agar

Komposisi :	Ammonium hydrogen fosfat	1 Gram
	DI-potassium hydrogen fodfat	1 Gram
	Sodium chlorid	5 Gram
	Magnesium sulfat	0,2 Gram
	Bromo thymol blue	0,08 Gram
	Agar-agar	12,5 Gram
	Aquadest	ad 1000 ml

Cara pembuatan : Bahan-bahan diatas dilarutkan kedalam Aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

#### 7. *Muller Hinton Agar* (MHA)

Komposisi :	Meat infusion	2,0 Gram
	Bacto asam kasamino	17,5 Gram
	Kanji	1,5 Gram
	Agar	17,0 Gram

Cara pembuatan : Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).