

**POTENSI SENYAWA ANTIMIKROBIA YANG DIHASILKAN
OLEH *Lactobacillus acidophilus* TERHADAP PENGHAMBATAN
PERTUMBUHAN *Escherichia coli***

SKRIPSI

oleh :
RINDU PUTU SEJATI
0310910046-91

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2008**



**POTENSI SENYAWA ANTIMIKROBIA YANG DIHASILKAN
OLEH *Lactobacillus acidophilus* TERHADAP PENGHAMBATAN
PERTUMBUHAN *Escherichia coli***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

oleh :
RINDU PUTU SEJATI
0310910046-91

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2008**



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**POTENSI SENYAWA ANTIMIKROBIA YANG DIHASILKAN
OLEH *Lactobacillus acidophilus* TERHADAP
PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN *Escherichia coli***

Oleh :
RINDU PUTU SEJATI
0310910046-91

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 15 Februari 2008
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing I

Pembimbing II

Tri Ardyati, M.Agr., PhD.
NIP. 131 960 437

Ir. Joni Kusnadi, M.Si
NIP. 131 688 158

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Agung Pramana W. M., M.Si
NIP. 131 971 480

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rindu Putu Sejati
NIM : 0310910046-91
Jurusan : Biologi
Penulisan skripsi berjudul :

**POTENSI SENYAWA ANTIMIKROBIA YANG DIHASILKAN
OLEH *Lactobacillus acidophilus* TERHADAP
PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN *Escherichia coli***

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 15 Februari 2008

Yang menyatakan

(Rindu Putu Sejati)
NIM. 0310910046-91

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



**POTENSI SENYAWA ANTIMIKROBIA YANG DIHASILKAN
OLEH *Lactobacillus acidophilus* TERHADAP
PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN *Escherichia coli***

ABSTRAK

Lactobacillus acidophilus adalah bakteri asam laktat yang tergolong GRAS (*Generally Recognized as Safe*) sehingga berpotensi digunakan sebagai bahan pengawet alami karena mampu menghasilkan berbagai senyawa yang diduga memiliki aktivitas antimikrobia, diantaranya asam laktat, diasetil, hidrogen peroksida dan bakteriosin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* dalam menghambat pertumbuhan *E. coli*, mendeteksi golongan senyawa antimikrobia (asam atau bakteriosin) yang berperan dalam penghambatan tersebut dan mengetahui konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh *E. coli*. Tahapan penelitian ini meliputi uji antagonis senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* terhadap penghambatan pertumbuhan *E. coli* dan deteksi golongan senyawa antimikrobia (asam atau bakteriosin) dilakukan dengan metode *Agar Well Diffusion* serta uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) dengan metode *broth dilution*. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Hasil uji antagonis menunjukkan bahwa senyawa antimikrobia tersebut mampu menghambat pertumbuhan *E. coli*, ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat, dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 6,91 mm. Golongan senyawa antimikrobia yang berperan dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* diduga kuat merupakan aktivitas dari asam laktat. Konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* adalah sebesar 12,5%, sedangkan konsentrasi terendah yang mampu membunuh *E. coli* adalah sebesar 15%.

Kata kunci : Senyawa antimikrobia, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli*

repository.ub.ac

POTENCY OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES
PRODUCED BY *Lactobacillus acidophilus* TO INHIBIT THE
GROWTH OF *Escherichia coli*

ABSTRACT

Lactobacillus acidophilus is a GRAS (Generally Recognized as Safe) lactic acid bacteria that has a potency to be used as biopreservative, because of its ability to produce some substances estimated has antimicrobial activity, such as lactic acid, diacetyl, hydrogen peroxide and bacteriocin.. The objectives of this research were to observe the potency of antimicrobial substances produced by *Lactobacillus acidophilus* to inhibit the growth of *E. coli*, to detect the kind of antimicrobial substances which has role in the inhibition, to determine MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration). The potency of antimicrobial substances and the kind of antimicrobial substances in bacterial inhibition was tested with antagonist assay using agar well diffusion method, MIC and MBC of antimicrobial substances was assayed using broth dilution method. The data was analysed descriptively. Antagonist assay showed a clear zone around the well, means that antimicrobial substances has ability to inhibit the growth of *E coli* and the kind of antimicrobial substances capable to inhibit *E coli* was estimated from lactid acid activity. The lowest concentration of antimicrobial substances that can inhibit the growth (MIC) of *E coli* was 12,5% and the lowest concentration of antimicrobial substances that can kill (MBC) *E coli* was 15%.

Keyword : Antimicrobial substances, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli*

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Potensi Senyawa Antimikrobia Yang Dihasilkan Oleh *Lactobacillus acidophilus* Terhadap Penghambatan Pertumbuhan *Escherichia coli*". Penulisan skripsi ini, tidak lepas dari bantuan serta bimbingan berbagai pihak, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Tri Ardyati, M.Agr., PhD dan Bapak Ir. Joni Kusnadi, M.Si., selaku dosen pembimbing I dan II yang telah memberikan bimbingan dan mencurahkan perhatian sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
2. Ibu Dr. Agustin Krisna Wardhani, STP., M.Si, Ibu Dr. Sri Widyarti, M.Si dan Ibu Zulfaida Penata Gama, M.Si., yang telah bersedia menjadi penguji dan memberikan saran serta masukan yang sangat bermanfaat demi penulisan tugas akhir yang lebih baik.
3. Bapak Dr. Agung Pramana W.M., MS. selaku Ketua Jurusan Biologi yang telah memberikan motivasi bagi penulis untuk menyelesaikan penulisan tugas akhir.
4. Bapak Yoga Dwi Jatmiko, S.Si yang telah memberikan banyak masukan pada penyusunan tugas akhir.
5. Mama, Papa, Anugerah Pagiku dan Semua Anggota Keluarga yang telah memberikan doa, dukungan serta semangatnya.
6. Microbiology Crew serta teman-teman Biologi 2003, atas segala bantuan, dukungan, semangat dan kebersamaannya.
7. GDB, atas semangat dan dukungannya.
8. Semua pihak yang telah membantu penulis, yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih sangat jauh dari sempurna karena masih banyak yang harus dibenahi dan dipelajari. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak dan dapat menunjang ilmu pengetahuan dan teknologi.

Malang, 15 Februari 2008
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	iii
LEMBAR PERNYATAAN	vi
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Batasan Masalah	2
1.4. Tujuan	3
1.5. Manfaat	3
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Perkembangan Metode Pengawetan Makanan	4
2.2. Bakteri Asam Laktat.....	4
2.3. Senyawa Antimikrobia Yang Dihasilkan Oleh Bakteri Asam Laktat	6
2.4. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	7
2.5. <i>Escherichia coli</i>	8
2.6. Pengujian Aktivitas Antimikrobia, MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) dan MBC (<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>)	8
 BAB III METODE PENELITIAN	
3.1. Waktu dan Tempat	10
3.2. Alat dan Bahan Penelitian	10
3.2.1 Alat Penelitian	10
3.2.2 Bahan Penelitian.....	10

3.3. Peremajaan Bakteri.....	11
3.4. Pewarnaan Gram	11
3.5. Uji Fermentasi Gula <i>Lactobacillus acidophilus</i>	12
3.6. Persiapan Inokulum <i>Escherichia coli</i>	12
3.7. Pembuatan Kurva Standar Jumlah Sel <i>Lactobacillus acidophilus</i>	12
3.8. Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus acidophilus</i>	13
3.9. Uji Antagonis Senyawa Antimikrobia yang Dihasilkan oleh <i>Lactobacillus acidophilus</i> Terhadap <i>Escherichia coli</i>	14
3.9.1. Persiapan Larutan <i>Cell Free Supernatan</i> (CFS)	
3.9.2. Analisis Total Asam	14
3.9.3. Uji Antagonis Senyawa Antimikrobia (CFS) <i>Lactobacillus acidophilus</i> Terhadap <i>Escherichia coli</i>	15
3.10. Deteksi Golongan Senyawa Antimikrobia (Asam atau Bakteriosin) yang Dihasilkan Oleh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	15
3.11. Uji MIC dan MBC.....	16
3.12. Analisis Data	17

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus acidophilus</i>	18
4.2. Hasil Uji Antagonis Senyawa Antimikrobia <i>Lactobacillus acidophilus</i> Terhadap <i>Escherichia coli</i>	19
4.3. Hasil Deteksi Golongan Senyawa Antimikrobia (Asam atau Bakteriosin) yang Dihasilkan Oleh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	20
4.4. Hasil Uji MIC dan MBC	22

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan.....	24
5.2. Saran.....	24

DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN	29

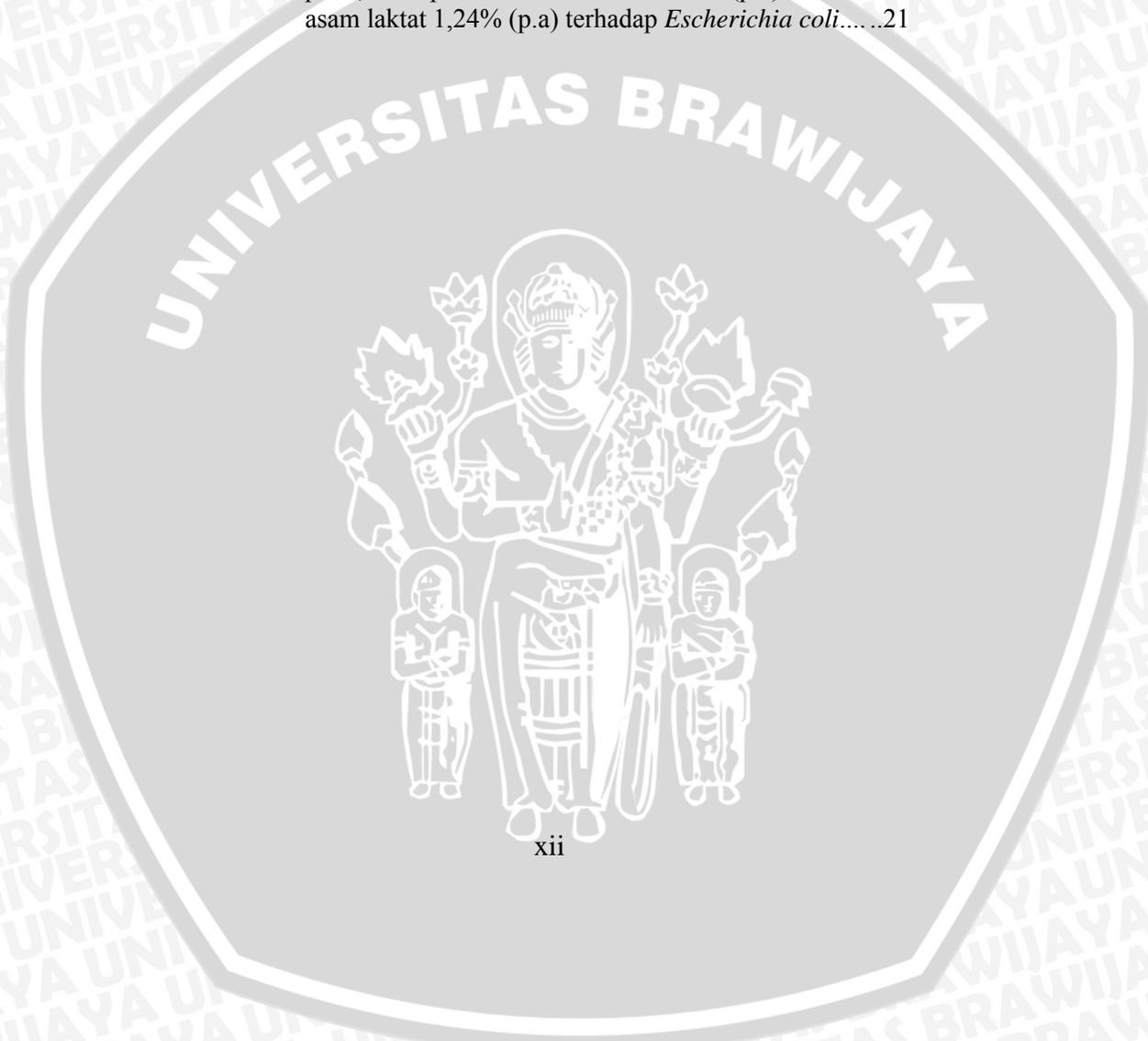
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil Uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) dan MBC (<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>) melalui penghitungan <i>Total Plate Count</i> (TPC) pada media NA	23



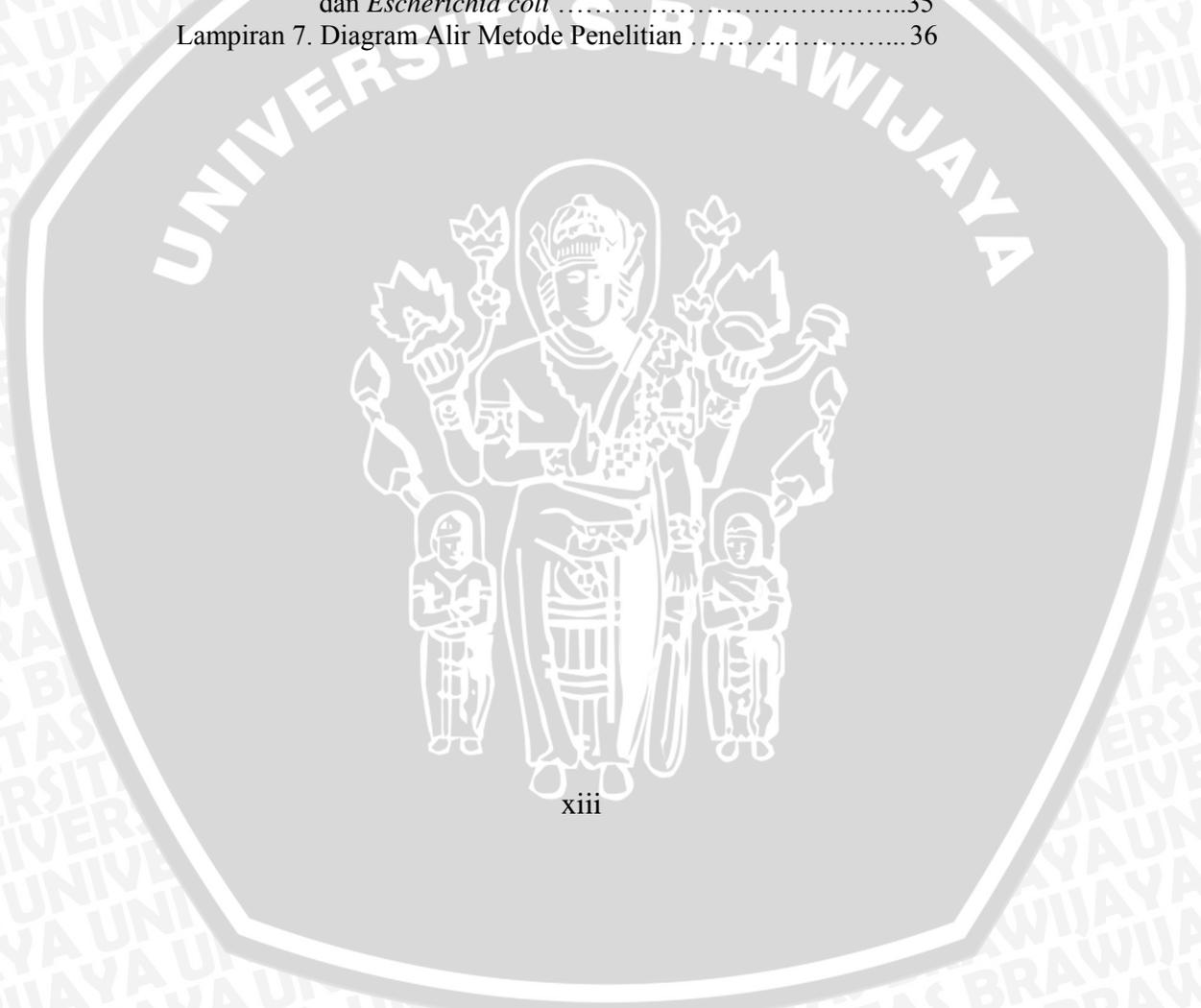
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus acidophilus</i> pada media MRS <i>broth</i> yang diinkubasi dalam <i>rotary shaker</i> bersuhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm	18
Gambar 4.2 Hasil uji antagonis senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh <i>Lactobacillus acidophilus</i> terhadap <i>Escherichia coli</i>	19
Gambar 4.3 Hasil uji antagonis CFS <i>Lactobacillus acidophilus</i> pH 3,9 dan pH 7 serta asam laktat 90% (p.a) dan asam laktat 1,24% (p.a) terhadap <i>Escherichia coli</i>	21



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Data Kurva standar <i>Lactobacillus acidophilus</i>	29
Lampiran 2. Data Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	30
Lampiran 3. Hasil Uji Antagonis Senyawa Antimikrobia <i>Lactobacillus acidophilus</i>	31
Lampiran 4. Hasil Uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) dan MBC (<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>) melalui Pengukuran <i>Optical Density</i> dan Penghitungan <i>Total Plate Count</i> (TPC)	32
Lampiran 5. Gambar Hasil Uji Fermentasi Gula (Pembentukan Gas) Pada <i>Lactobacillus acidophilus</i>	34
Lampiran 6. Hasil Pewarnaan Gram <i>Lactobacillus acidophilus</i> dan <i>Escherichia coli</i>	35
Lampiran 7. Diagram Alir Metode Penelitian	36



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri asam laktat merupakan kelompok mikroorganisme yang berperan penting dalam bidang industri, khususnya industri makanan. Bakteri asam laktat berperan penting dalam produksi makanan fermentasi dan beberapa diantaranya menunjukkan kemampuan dalam menghambat pertumbuhan berbagai mikroorganisme penyebab kerusakan pada bahan pangan (Jack dkk., 1995). Bakteri asam laktat mampu menghasilkan berbagai metabolit atau senyawa yang diduga memiliki aktivitas antimikrobia, diantaranya asam laktat, diasetil, hidrogen peroksida dan bakteriosin. Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri yang tergolong GRAS (*Generally Recognized as Safe*), dengan beberapa kemampuannya dalam menghasilkan berbagai metabolit tersebut, kelompok bakteri ini berpotensi sebagai bahan pengawet alami (biopreservatif) (O'Keefe dan Hill, 1999).

Lactobacillus acidophilus merupakan salah satu jenis bakteri asam laktat yang banyak digunakan dalam industri makanan, misalnya pada produksi susu fermentasi atau yogurt (Wardlow, 1999). Proses fermentasi tersebut menghasilkan asam laktat sebagai hasil akhir dari pemecahan laktosa menjadi glukosa dan galaktosa oleh enzim laktase. Asam laktat yang dihasilkan menyebabkan terjadinya penurunan pH, sehingga dapat mengurangi keberadaan bakteri patogen dan pembusuk pada makanan, misalnya *Escherichia coli* (Hidayat dkk., 2006). Aktivitas antimikrobia yang berhubungan dengan *Lactobacillus acidophilus* mulai diteliti sejak tahun 1960. Pada tahun 1983, karakteristik bakteriosin dari *Lactobacillus acidophilus* N2 yang merupakan protein atau peptide ekstraseluler yang tahan terhadap suhu tinggi dan mudah diuraikan oleh enzim protease telah diketahui dan disebut lactacin B (Ray dan Daeschel, 1992). Ray dan Daeschel (1992) juga menjelaskan tentang aktivitas senyawa diasetil, disebutkan bahwa aktivitas antibakteri dari senyawa ini terjadi hanya pada konsentrasi tinggi, yaitu apabila dipekatkan pada konsentrasi 500-2500 mg/ml dan pada konsentrasi rendah tidak efektif.

Penelitian Coconnier dkk. (1997), menunjukkan bahwa supernatan *Lactobacillus acidophilus* strain LB menghasilkan senyawa antibakteri yang dapat menurunkan viabilitas beberapa bakteri patogen, diantaranya *Escherichia coli*. Senyawa tersebut merupakan komponen yang bersifat asam, tahan terhadap suhu tinggi dan aktivitasnya berkurang setelah perlakuan dengan penambahan enzim proteinase K.

Menurut WHO (2005) dan Sukanto dkk. (2001), *Escherichia coli* merupakan bakteri yang umum ditemukan atau termasuk flora normal dalam saluran pencernaan mamalia. *Escherichia coli* bersifat patogen apabila mengkontaminasi bahan pangan, misalnya produk daging olahan dan susu segar. *Escherichia coli* menghasilkan eksotoksin yang dapat mengakibatkan terjadinya diare sebagai suatu gejala penyakit infeksi yang disebabkan. *Escherichia coli* sebagai penyebab diare perlu dihambat pertumbuhannya karena dapat mengakibatkan kematian. Catatan WHO menyebutkan, diare membunuh dua juta anak di dunia setiap tahun. Oleh karena itu diperlukan penelitian mengenai efektivitas senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* untuk menghambat dan mengendalikan pertumbuhan *Escherichia coli*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dirumuskan suatu permasalahan penelitian yaitu :

1. Benarkah senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*?
2. Golongan senyawa antimikrobia apakah (asam atau bakteriosin) yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* yang berperan dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*?
3. Berapakah konsentrasi terendah senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh *Escherichia coli*?

1.3 Batasan Masalah

Pada penelitian ini, golongan senyawa antimikrobia yang diamati, dibatasi hanya pada peranan asam atau bakteriosin saja.

1.4 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui kemampuan senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*.
2. Mendeteksi golongan senyawa antimikrobia (asam atau bakteriosin) yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* yang berperan dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*.
3. Mengetahui konsentrasi terendah dari senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh *Escherichia coli*.

1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kemampuan atau efektivitas senyawa antimikrobia *Lactobacillus acidophilus* yang berperan dalam mengendalikan dan menghambat laju pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Perkembangan Metode Pengawetan Makanan

Metode pengawetan makanan telah berkembang sejak tahun 40.000-10.000 SM (Ray dan Daeschel, 1992). Tujuan utama manusia melakukan pengawetan makanan adalah untuk memperpanjang daya simpan, karena adanya mekanisme yang menimbulkan pembusukan pada produk pangan tersebut. Secara umum pembusukan bahan pangan terjadi melalui aktivitas mikroorganisme, proses metabolisme dalam bahan pangan, oksidasi, kesalahan dalam pengolahan dan kerusakan mekanis serta kontaminasi bahan pangan dengan senyawa-senyawa yang tidak diinginkan (Buckle dkk., 1995).

Pada awal perkembangan metode pengawetan makanan, hanya digunakan teknik-teknik fisika seperti pemanasan, pendinginan dan pengasapan. Kemudian berkembanglah teknik biologi yaitu metode fermentasi dan pemanfaatan tumbuh-tumbuhan (herbal) sebagai pengawet dan bahkan secara kimiawi yaitu pemanfaatan nitrat, tepatnya pada tahun 1000 SM – 1800 M. Pada abad ke-20, inovasi teknik pengawetan makanan mulai berkembang pesat, salah satu diantaranya adalah pemanfaatan senyawa metabolit mikrobia peptida yang disebut nisin dimana mempunyai aktivitas antimikrobia yang dapat melawan berbagai bakteri patogen maupun bakteri pembusuk pada makanan (Ray dan Daeschel, 1992).

Pada saat ini konsumen cenderung lebih tertarik pada makanan yang tidak mengandung bahan pengawet kimia dan beralih pada bahan pengawet alami yang aman bagi kesehatan. Di Amerika Serikat, hal ini menyebabkan dilema antara bahaya penggunaan pengawet sintetis dan jenis bahan pengawet yang cocok. Oleh karena itu dibuatlah suatu peraturan yang mengatur penggunaan bahan pengawet kimiawi sehingga muncul istilah GRAS (*Generally Recogniced as Safe*) yang meliputi asam propionat, asam sorbat, asam laktat dan golongan asam organik lainnya serta ditemukannya senyawa yang dihasilkan oleh bakteri yang sifatnya mirip dengan antibiotik yaitu bakteriosin. Pada umumnya, kelompok bakteri asam laktat mampu menghasilkan senyawa antimikrobia yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri penyebab kerusakan pada

makanan terutama selama proses fermentasi (Ray dan Daeschel, 1992; Chen dan Hoover, 2003).

2.2 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif, tidak membentuk spora, bersifat mikroaerofilik atau anaerobik tetapi toleran terhadap udara dan memetabolisme karbohidrat melalui jalur fermentasi. Bakteri asam laktat diasumsikan berada pada makanan yang kaya akan nutrisi seperti susu dan daging. Sebagian besar bakteri asam laktat toleran terhadap asam (Yousef dan Carlstrom, 2003). Bakteri asam laktat berperan penting dalam produksi makanan fermentasi dan beberapa diantaranya menunjukkan kemampuan dalam menghambat pertumbuhan berbagai mikroorganisme penyebab kerusakan pada bahan pangan (Jack dkk., 1995).

Prinsip utama fermentasi oleh bakteri asam laktat adalah proses pemecahan laktosa menjadi monosakarida yaitu glukosa dan galaktosa yang akan diubah menjadi asam laktat dengan bantuan enzim laktase. Sebagai contoh dari proses ini antara lain produksi susu fermentasi, *sauerkraut* dari sayuran dan *pickles* dari mentimun (Tortora dkk., 2001).

Terdapat dua jalur fermentasi pada bakteri asam laktat yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Homofermentatif melalui jalur glikolisis yang menghasilkan produk akhir berupa asam laktat lebih dari 85%. Heterofermentatif melalui jalur fosfoketolase yang menghasilkan campuran asam laktat, etanol, karbon dioksida sebagai produk akhirnya (Fardiaz, 1993).

Bakteri yang terlibat dalam fermentasi asam laktat adalah bakteri asam laktat yang termasuk ke dalam familia Lactobacillaceae dan Streptococcaceae serta dibedakan atas empat genus yaitu *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* dan *Pediococcus*. Bakteri ini sering digunakan pada fermentasi berbagai produk seperti susu, daging dan sayuran. Golongan bakteri tersebut mempunyai ciri-ciri Gram positif, berbentuk batang atau *coccus*, tidak menghasilkan enzim katalase, nonmotil, mikroaerofilik dengan hasil utama asam laktat dan kadang-kadang asam organik lainnya (asam asetat, asam propionat) dan karbon dioksida. Bakteri ini membutuhkan nutrisi yang kompleks, memerlukan asam amino dan vitamin untuk pertumbuhannya serta menggunakan laktosa sebagai sumber energi (Volk, 1993; Fardiaz, 1993).

2.3 Senyawa Antimikrobia Yang Dihasilkan Oleh Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat mampu menghasilkan berbagai metabolit atau senyawa yang diduga mempunyai aktivitas antimikrobia, diantaranya asam laktat, diasetil, hidrogen peroksida dan bakteriosin (O'Keeffe dan Hill, 1999). Asam laktat adalah hasil metabolisme utama bakteri asam laktat yang merupakan hasil akhir dari metabolisme gula. Cara kerja asam laktat dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah melalui penurunan pH yang menyebabkan sistem gradien proton elektrokimia pada membran bakteri menjadi tidak bekerja, dimana proton menyebabkan kondisi sitoplasma menjadi asam dan menyebabkan hilangnya potensial proton transmembran (O'Keeffe dan Hill, 1999; Jordan dkk., 1999).

Diasetil sebagai senyawa antimikrobia berikutnya, merupakan senyawa hasil dari metabolisme sitrat. Diasetil yang dikombinasikan dengan perlakuan suhu akan memberikan efek bakterisidal lebih kuat dibandingkan tanpa perlakuan suhu. Diasetil menimbulkan aroma yang tidak diharapkan pada produk susu. Selain itu, diasetil bersifat mudah menguap sehingga kurang efektif jika diaplikasikan untuk pengawet makanan (Ray, 2000). Diasetil mampu menghambat khamir, bakteri Gram positif dan negatif (O'Keeffe dan Hill, 1999). Diasetil memiliki sifat antimikrobia hanya dalam konsentrasi tinggi, sedangkan pada konsentrasi rendah tidak efektif, bahkan dapat dihancurkan oleh beberapa mikroorganisme. Diasetil akan mempunyai efek antibakteri apabila dipekatkan pada konsentrasi 500-2500mg/mL (Ray dan Daeschel, 1992).

Senyawa antimikrobia berikutnya adalah hidrogen peroksida (H_2O_2) yang dihasilkan hanya pada kondisi aerob karena kebanyakan bakteri asam laktat tidak memiliki katalase, pseudokatalase atau peroksidase, khususnya *Lactobacillus* spp. Senyawa ini dilepas ke lingkungan untuk melindungi diri dari pengaruh antimikrobia lainnya. Produksi H_2O_2 akan sangat sedikit jika berada dalam kondisi anaerob dan pada media pepton yang diinkubasi selama 2 hari pada suhu 30°C hanya dihasilkan 8-9 mg/mL (O'Keeffe dan Hill, 1999; Ray, 2000; Price dan Lee, 1970).

Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat merupakan protein kompleks atau protein ekstraseluler yang bekerja aktif menghambat pertumbuhan bakteri lain, terutama bakteri yang berkerabat dekat dengan bakteri penghasil bakteriosin tersebut

(O'Keeffe dan Hill, 1999). Bakteriosin mempunyai sifat yang stabil pada suhu tinggi, sehingga mempunyai potensi untuk digunakan dalam proses pengolahan pangan. Bakteriosin dinyatakan aman sebagai bahan pengawet karena senyawa tersebut termasuk protein atau peptida ekstraseluler sehingga mudah terurai oleh enzim protease dalam saluran pencernaan manusia (Ray dan Daeschel, 1992; Pal dkk., 2005). Cara kerja bakteriosin dalam membunuh bakteri adalah membentuk lubang pada membran sel atau pori-pori sehingga dapat merusak energi potensial dari sel bakteri yang sensitif terhadap bakteriosin tersebut (Oscariz dan Pisabarro, 2001).

Menurut Brooks dkk. (2001), antimikrobia yang ideal dalam menghambat pertumbuhan bakteri harus menunjukkan adanya toksisitas yang selektif, yang berarti bahwa antimikrobia tersebut hanya bereaksi pada parasit namun tidak membahayakan inang. Mekanisme kerja antimikrobia dapat dikelompokkan menjadi empat kelompok utama, yaitu penghambatan terhadap sintesis dinding sel, penghambatan terhadap fungsi membran sel, penghambatan terhadap sintesis protein dan penghambatan terhadap sintesis asam nukleat.

2.4 *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus termasuk dalam genus *Lactobacillus*. Genus ini umumnya berbentuk batang panjang tetapi terkadang hampir kokoid, berukuran 0,5-1,2 x 1,0-10,0 μm . *Lactobacillus* termasuk fakultatif anaerobik, kadang-kadang mikroaerofilik. *Lactobacillus* termasuk kemoautotrof, membutuhkan media yang kaya dan kompleks, metabolismenya tergolong fermentatif. Pertumbuhannya optimum pada suhu 30-40°C. *Lactobacillus* tersebar dalam lingkungan, khususnya dalam produk makanan dari hewan dan tumbuhan, secara normal tinggal dalam saluran pencernaan burung dan mamalia serta vagina mamalia. *Lactobacillus* jarang yang bersifat patogen dan merupakan kelompok asidofilik dan pertumbuhannya menghasilkan asam, menurunkan pH lingkungan dan menghambat pertumbuhan mikroba lain yang berada di lingkungan tersebut (Holt dkk., 2000; Sudarmadji, 1989).

Lactobacillus acidophilus merupakan bakteri Gram positif yang membutuhkan vitamin B kompleks dan asam amino untuk pertumbuhannya. *Lactobacillus acidophilus* hanya memproduksi asam laktat sebagai hasil akhir fermentasinya. Bakteri ini dapat ditemukan dalam saluran pencernaan meskipun kondisinya sangat

asam dan dapat stabil berada dalam usus. *Lactobacillus acidophilus* memegang peranan penting dalam saluran pencernaan, karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan, seperti *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens* dan enteropatogenik *Escherichia coli*. Bakteri ini dapat menghasilkan suatu senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri-bakteri tersebut, misalnya asam laktat, hidrogen peroksida dan bakteriosin (Appliedhealth, 2007)

2.5 *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang, tunggal atau berpasangan, berukuran 1,0-1,5 x 2,5-6,0 μm , bersifat motil dan nonmotil dengan flagella peritrikus. Bakteri ini bersifat fakultatif anaerobik, kisaran suhu pertumbuhannya adalah 10-40°C dan optimum pada suhu 37,5°C dengan pH medium untuk pertumbuhannya adalah 7-7,5 (Fardiaz, 1993).

Escherichia coli merupakan bakteri yang umum ditemukan dalam saluran pencernaan manusia dan hewan berdarah panas. *Escherichia coli* bersifat patogen apabila mengkontaminasi bahan pangan, misalnya produk daging olahan dan susu segar. *Escherichia coli* menghasilkan eksotoksin yang dapat mengakibatkan terjadinya diare sebagai suatu gejala penyakit infeksi yang disebabkan. *Escherichia coli* sebagai penyebab diare perlu dihambat pertumbuhannya karena dapat mengakibatkan kematian (WHO, 2005 dan Sukanto dkk., 2001).

2.6 Pengujian Aktivitas Antimikrobia, MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*)

Pengujian aktivitas antimikrobia dapat dilakukan dengan pengujian secara *in vitro* yaitu menggunakan metode *disk agar diffusion*, metode *agar well diffusion* ataupun metode *broth dilution* (Cowan, 1999). Menurut Tagg dan Mcgiven (1971), *agar well diffusion* merupakan salah satu metode yang digunakan untuk menguji atau mendeteksi aktivitas senyawa antimikrobia, diantaranya bakteriosin. Berdasarkan metode ini, pengujian aktivitas antimikrobia dilakukan dengan meneteskan senyawa antimikrobia ke dalam sumuran. Sumuran dibuat dengan cara melubangi media pada

dalam cawan petri (yang mengandung bakteri uji) menggunakan *cork borer* steril. Senyawa antimikrobia akan berdifusi ke media disekitarnya, sehingga bakteri uji yang peka terhadap senyawa tersebut tidak dapat tumbuh pada saat inkubasi. Adanya zona bening yang terbentuk disekitar sumuran menunjukkan adanya aktivitas antimirobia.

Daya hambat senyawa antimikrobia dapat diketahui dengan melakukan pengujian lebih lanjut, yaitu penentuan dosis penghambatan minimal suatu senyawa antimikrobia terhadap bakteri uji atau disebut dengan *minimum inhibitory concentration* (MIC) dan *minimum bactericidal concentration* (MBC). Penentuan nilai MIC dilakukan dengan metode *broth dilution* yaitu membuat suatu serial kultur suspensi dalam tabung, dimana masing-masing tabung mengandung senyawa antimikrobia dengan konsentrasi yang berbeda dan diinokulasikan dengan kultur bakteri uji dengan jumlah yang sama pada tiap tabungnya. Setelah inkubasi, dilakukan pengecekan kekeruhan suspensi yang mengindikasikan adanya pertumbuhan bakteri. Suspensi dengan konsentrasi senyawa antimikrobia terendah yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri merupakan nilai MIC dari senyawa antimikrobia tersebut. Adanya penghambatan pertumbuhan pada serial kultur suspensi dapat dikonfirmasi dengan melakukan *total plate count*. Apabila tidak terdapat pertumbuhan bakteri dalam cawan petri, berarti serial kultur dengan konsentrasi senyawa antimikrobia tersebut dapat membunuh semua bakteri uji. Konsentrasi terendah yang dapat membunuh semua bakteri uji merupakan nilai MBC dari senyawa antimikrobia (Madigan dkk., 2003; Ingraham dan Ingraham, 2004).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2007 sampai Januari 2008. Tempat penelitian di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer, cawan petri, gelas beker, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, botol 100 ml, spatula, *blue tip*, *yellow tip*, mikropipet (Biopette Lapnett), pipet tetes, jarum ose, jangka sorong (*Digimatic Caliper*, Mititoyo), tabung buret, tabung *ependorf*, vorteks (DS Instrument), *refrigerator*, *cork borer* (diameter 6mm), *disposable syringe* 5 ml (Terumo), membran filter (pori-pori 0,22 μm) (Millex[®]GP), api bunsen, *haemocytometer Neubauer*, *handtally counter*, *colony counter* (Jambu Pershad and Sons), gelas obyek, gelas penutup, mikroskop (Olympus CX21), timbangan digital (ANDGX-600), penangas air, autoklaf (TOMY), oven (Heraeus), inkubator (Heraeus dan Memmert), pH meter digital (Hanna), *rotary shaker* (Kuhner), sentrifus, spektrofotometer (Shimadzu UVMMini 1240), *Laminar Air Flow* (Captair Bio by Erlab), Kamera Digital (Sony DSC W55), *aluminium foil*, plastik *wrap*, kertas coklat, kapas, karet gelang, label dan korek api.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, PAU Pangan dan Gizi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta dan bakteri *Escherichia coli* yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang. Bahan lain yang digunakan yaitu media *de Mann*

Rogosa Sharpe (MRS) Agar, MRS broth (Merck), Nutrient Agar (Difco), Nutrient Broth (Merck), Luria Bertani Broth (Merck), garam fisiologis 0,85%, larutan Gram A (kristal violet), larutan Gram B (Lugol's iodine), larutan Gram C (etanol aseton), larutan Gram D (Safranin), minyak emersi, formalin, alkohol 70%, aquadest, NaOH 0,1 N, indikator PP (*Phenolphthalein*), 5N NaOH, Asam laktat 90% (Merck).

3.3 Peremajaan Bakteri

Lactobacillus acidophilus dari media MRS Agar miring diambil satu oose dan diinokulasikan ke dalam 10 ml media MRS cair, selanjutnya diinkubasi dalam *rotary shaker* bersuhu 37°C selama 24 jam pada kecepatan 120 rpm. Suspensi tersebut kemudian diambil sebanyak 0,1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang berisi 0,9 ml garam fisiologis 0,85% sehingga menjadi pengenceran 10^{-1} . Pengenceran dilakukan berseri sampai pengenceran 10^{-7} . Suspensi pengenceran 10^{-3} hingga 10^{-7} diinokulasikan sebanyak 0,1 ml pada cawan petri yang berisi media MRS Agar yang telah memadat. Selanjutnya dilakukan *spread plate* dengan *dryglassky triangle* dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Koloni tunggal yang tumbuh dipilih untuk digunakan dalam penelitian dan dicuplik dengan oose kemudian digoreskan pada media MRS Agar miring untuk disimpan dalam *refrigerator* suhu 4°C. Proses peremajaan ini juga dilakukan untuk bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan media *Luria Bertani* (LB) cair dan media *Nutrient Agar* (NA).

3.4 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang akan digunakan tidak mengalami kontaminasi. Metode pewarnaan Gram dilakukan berdasarkan Benson (2002), bakteri dari koloni tunggal diambil dengan oose dan dibuat apusan di atas gelas obyek dengan cara melewatkannya di atas api bunsen. Apusan yang telah kering, ditetesi Gram A (kristal violet) selama 1 menit kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Pewarnaan dilanjutkan dengan meneteskan Gram B (iodin) di atas apusan, dibiarkan selama 1 menit kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Apusan yang telah kering, ditetesi

Gram C selama 60 detik, dibilas dan dikeringanginkan kemudian dilanjutkan dengan pewarnaan Gram D (safranin), dibiarkan selama 1 menit, kemudian dibilas dan dikeringanginkan. Preparat yang sudah kering, ditutup dengan gelas penutup dan diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x.

3.5 Uji Fermentasi Gula *Lactobacillus acidophilus*

Uji ini dilakukan untuk mengetahui hasil akhir fermentasi gula oleh *Lactobacillus acidophilus* dalam menghasilkan gas atau karbondioksida, sehingga dapat diketahui jalur fermentasi gulanya, yaitu homofermentatif atau heterofermentatif. Uji ini dilakukan berdasarkan Hamasaki dkk. (2002), *Lactobacillus acidophilus* ditumbuhkan dalam tabung reaksi yang berisi media MRS cair yang didalamnya berisi tabung Durham. Inokulum diinkubasi selama 48 jam pada *rotary shaker* bersuhu 37°C. Gelembung udara yang terbentuk dalam tabung Durham mengindikasikan bahwa bakteri membentuk karbon dioksida sebagai hasil akhir fermentasinya, sehingga bakteri digolongkan heterofermentatif (pembentukan asam dikonfirmasi pada metode 3.9.1 dan 3.9.2). Apabila dalam tabung Durham tidak terdapat gelembung udara, maka bakteri digolongkan bersifat homofermentatif, dimana hasil akhir fermentasi gula sekitar 85% adalah asam laktat (O'Keeffe dan Hill, 1999).

3.6 Persiapan Inokulum *Escherichia coli*

Koloni tunggal *Escherichia coli* umur 24 jam pada media *Nutrient Agar* dicuplik dengan jarum ose dan diinokulasikan dalam 15 ml media LB cair. Suspensi diinkubasi dalam *rotary shaker* suhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Sebanyak 10^7 sel/ml dan 3×10^5 sel/ml *Escherichia coli* digunakan untuk uji antagonis, MIC dan MBC serta deteksi golongan senyawa antimikrobia. Jumlah sel *Escherichia coli* dihitung menggunakan *haemocytometer* dan dilakukan pengenceran apabila jumlah sel lebih banyak dari jumlah yang dibutuhkan untuk perlakuan.

3.7 Pembuatan Kurva Standar Jumlah Sel *Lactobacillus acidophilus*

Pembuatan kurva standar bertujuan untuk mengetahui jumlah sel bakteri per ml sehingga dapat digunakan sebagai acuan pada

pembuatan kurva pertumbuhan dalam menentukan jumlah sel per ml. Pembuatan kurva standar diawali dengan menumbuhkan *Lactobacillus acidophilus* pada media MRS cair yang berfungsi sebagai starter dan stok inokulum. *Lactobacillus acidophilus*, diambil koloni tunggal menggunakan jarum ose kemudian diinokulasikan ke dalam 20 ml media MRS cair dan dihomogenkan dengan vorteks (disebut sebagai starter). Starter diinkubasi pada suhu 37°C pada *rotary shaker* selama 24 jam, kemudian diambil 10% (sebanyak 5 ml) dan dimasukkan ke dalam 45 ml media MRS cair (stok). Inokulum stok diinkubasi selama 24 jam pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm suhu 37°C.

Pembuatan kurva standar dilakukan dengan membuat seri perbandingan antara stok inokulum dan media MRS cair steril. Perbandingannya yaitu 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6. Masing-masing suspensi bakteri dihitung jumlah sel per ml dengan *Haemocytometer Neubauer* dan *Handtally counter*, sedangkan *Optical Density* (OD) diukur dengan metode spektrofotometri menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm. Kurva standar bakteri diperoleh dengan membuat grafik regresi linier antara jumlah sel bakteri (x) dengan kekeruhan sel (OD) (y) sehingga didapatkan persamaan regresi linier yang dapat digunakan untuk menentukan jumlah sel bakteri per ml berdasarkan OD yang diperoleh.

3.8 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan untuk mengetahui fase-fase pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus*. Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan cara menginokulasikan 10% suspensi biakan bakteri yang berasal dari stok inokulum dengan jumlah sel 2×10^7 sel/ml ke dalam 120 ml media MRS cair. Suspensi selanjutnya dihomogenkan dan diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm suhu 37°C. Kurva pertumbuhan sel bakteri dibuat dengan cara melakukan pengukuran *Optical density* pada setiap jamnya hingga jam keempat, kemudian dilakukan pengukuran setiap 4 jam selama 48 jam. Nilai yang diperoleh dikonversikan ke jumlah sel per ml dengan menggunakan persamaan kurva standar jumlah sel bakteri (Tahap 3.7), selanjutnya dibuat kurva pertumbuhannya.

3.9 Uji Antagonis Senyawa Antimikrobia Yang Dihasilkan Oleh *Lactobacillus acidophilus* terhadap *Escherichia coli*

3.9.1 Persiapan Larutan *Cell Free Supernatant* (CFS) *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus ditumbuhkan dalam media MRS cair hingga akhir fase logaritmik. Supernatan diperoleh dengan sentrifugasi kultur (10000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C), kemudian dilakukan pengecekan pH dengan pH meter digital dan analisis total asam dengan metode titrasi. *Supernatan* yang didapatkan disterilisasi dengan melewatkannya pada membran filter berpori 0,22 µm sehingga didapatkan *Cell Free Supernatant* (CFS) (Savagado dkk., 2004).

3.9.2 Analisis Total Asam

Total asam diartikan sebagai jumlah keasaman yang dianggap sebagai asam laktat. Penghitungan total asam dilakukan dengan metode titrasi menggunakan 0,1 N NaOH. Sampel sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, ditambahkan akuades sampai tanda batas, lalu dihomogenkan dan disaring. Filtrat diambil sebanyak 10 ml dan dimasukkan dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan 2 tetes larutan 1% indikator *phenophthalein*. Filtrat dititrasi dengan 0,1 N NaOH sampai warna larutan berubah menjadi merah muda dan warna tersebut tidak hilang selama 30 detik lalu dihentikan dan dicatat volume NaOH yang digunakan. Penghitungan ini dilakukan sebanyak dua kali ulangan. Kadar total asam dihitung dengan rumus (Renggana, 1979):

$$\text{Total Asam(\%)} = \frac{V \times N \times fp \times \text{BM Asam Laktat}}{W} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan :

- V = Volume larutan NaOH (ml)
- N = Normalitas larutan NaOH
- fp = Faktor Pengenceran (100/10)
- BM Asam Laktat = 90
- W = Berat Cuplikan (mg)

3.9.3 Uji Antagonis Senyawa Antimikrobia (CFS)

Lactobacillus acidophilus terhadap *Escherichia coli*

Uji antagonis dilakukan dengan menggunakan metode sumur (*Agar Well Diffusion*) menurut Tagg dan McGiven (1971). Bakteri *Escherichia coli* (sebanyak 10^7 sel/ml, persiapan dilakukan berdasar metode 3.6) ditumbuhkan dalam media *Nutrient Agar*. Sumuran dibuat dengan cara melubangi media tersebut dengan *cork borer* steril (diameter 6 mm). Supernatan (CFS) sebanyak 50 μ l kemudian ditambahkan pada tiap-tiap sumuran. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati zona hambat yang terbentuk. Pengukuran zona hambat dilakukan dengan menggunakan jangka sorong (*digimatic caliper*). Pengujian ini dilakukan dengan tiga kali ulangan. Terbentuknya zona hambat menunjukkan kemampuan senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri uji yaitu *Escherichia coli*. Kontrol yang digunakan berupa media MRS cair steril yang dimasukkan ke dalam sumuran. Seluruh tahap perlakuan ini dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow*.

3.10 Deteksi Golongan Senyawa Antimikrobia (Asam atau Bakteriosin) yang dihasilkan *Lactobacillus acidophilus*

Deteksi senyawa antimikrobia yang dihasilkan *Lactobacillus acidophilus* apakah tergolong asam atau bakteriosin, yang berperan dalam penghambatan pertumbuhan *Escherichia coli*, dilakukan dengan membandingkan aktivitas penghambatan CFS *Lactobacillus acidophilus* pada pH awal (asam) dan pada pH 7, dengan metode *Agar Well Diffusion* (metode 3.9.3). Pengaturan pH menjadi 7 dilakukan dengan penambahan 5N NaOH dan diukur dengan pH meter digital. Penetralan pH bertujuan untuk menghilangkan aktivitas asam, sehingga apabila terjadi penghambatan pertumbuhan, disebabkan oleh aktivitas bakteriosin. Metode ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Todorov dan Dicks (2005), untuk mendeteksi aktivitas protein (bakteriosin). Aktivitas penghambatan yang terjadi dikonfirmasi dengan kontrol yakni asam laktat 90% (p.a) serta asam laktat yang telah diencerkan sesuai dengan kadar asam total yang terkandung dalam CFS.

3.11 Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*)

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) merupakan konsentrasi terendah suatu substansi yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji. Uji *Minimum Inhibitory Concentration* dilakukan dengan metode *broth dilution* (Ingraham dan Ingraham, 2004) dimana aktivitas senyawa antimikrobia *Lactobacillus acidophilus* dalam CFS diujikan terhadap *Escherichia coli*. Delapan tabung reaksi yang berisi suspensi biakan *Escherichia coli* (3×10^5 sel/ml) pada media *Luria Bertani* cair, masing-masing ditambahkan CFS dengan konsentrasi akhir yaitu 1%, 2,5%, 5%, 10%, 12,5%, 15%, 20% dan 25%. Suspensi yang telah ditambahkan CFS diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Penghambatan pertumbuhan bakteri uji diketahui dengan mengukur kekeruhan suspensi biakan (*optical density*) pada masing-masing konsentrasi CFS sebelum dan sesudah inkubasi pada panjang gelombang 600 nm. Blanko dibuat dengan seri konsentrasi larutan yang sama tanpa penambahan inokulum bakteri. Tidak adanya pertumbuhan bakteri uji, yang ditunjukkan dengan nilai *Optical Density* (OD) yang tetap (OD sebelum dan sesudah inkubasi sama) menunjukkan nilai MIC positif. Hasil ini kemudian diuji lebih lanjut menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC).

Metode *Total Plate Count* (TPC) dilakukan dengan menggunakan media *nutrient agar* (NA) secara *pour plate* dengan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Jumlah bakteri yang tumbuh pada media dihitung dan dibandingkan dengan jumlah bakteri pada suspensi awal (3×10^5 sel/ml) sehingga dapat diketahui nilai MIC dari persentase daya hambat senyawa antimikrobia *Lactobacillus acidophilus* terhadap bakteri uji (Rumus 2). Persentase daya hambat yang mencapai nilai 99% menunjukkan nilai MIC positif, dimana senyawa antimikrobia tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji hingga 99%. Persentase daya hambat yang mencapai nilai 100% menunjukkan nilai MBC positif karena senyawa antimikrobia tersebut mampu membunuh semua bakteri uji.

$$\text{Daya Hambat (\%)} = (a-b)/a \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan: a= Jumlah sel bakteri dalam suspensi (3×10^5 sel/ml)

b= Jumlah koloni yang tumbuh

(Saifudin dan Astuti, 2005)

3.12 Analisis Data

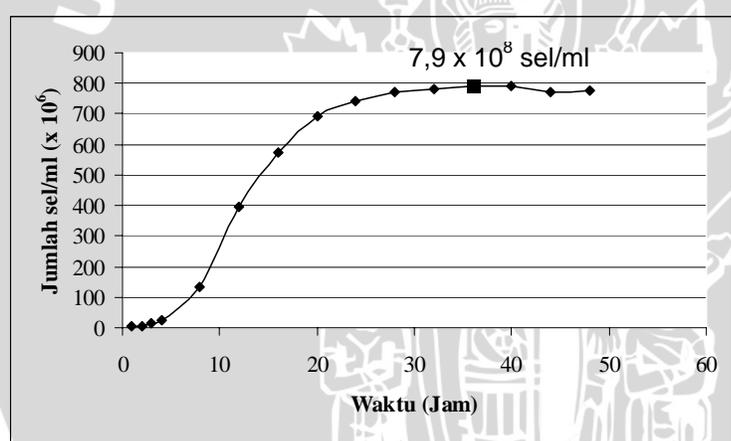
Data hasil uji antagonis, *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) dan deteksi golongan senyawa antimikrobia yang dihasilkan *Lactobacillus acidophilus* dianalisis secara deskriptif.



**BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*

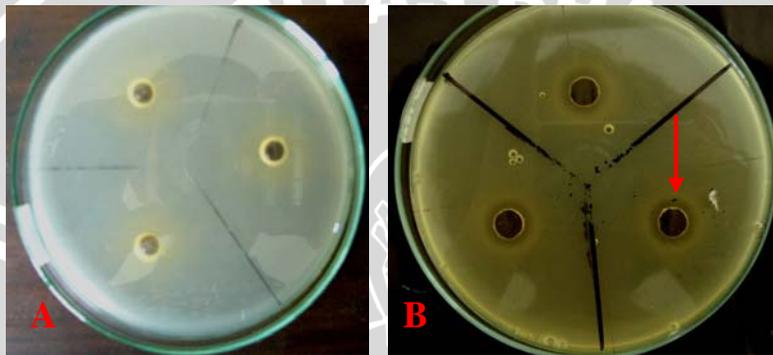
Fase pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* pada media MRS cair yang diinkubasi dalam *rotary shaker* bersuhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm, menunjukkan bahwa akhir fase logaritmik terjadi pada jam ke-36 dengan jumlah sel $7,9 \times 10^8$ sel/ml (Gambar 4.1). Metabolit yang mempunyai aktivitas antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus*, diantaranya asam laktat dan bakteriosin yang dihasilkan mulai awal fase hingga akhir fase logaritmik, sehingga pada akhir fase logaritmik, senyawa antimikrobia yang dihasilkan mencapai jumlah maksimal. Menurut Madigan dkk. (2003), bakteri menghasilkan metabolit dengan jumlah maksimal terjadi pada akhir fase logaritmik atau awal fase stasioner. Contoh metabolit diantaranya yaitu asam-asam organik, antibiotik dan asam amino. Menurut Rattanachaikunsopon dan Phumkhachorn (2000) serta Todorov dkk. (2003), bakteriosin merupakan senyawa hasil metabolisme dan optimum diproduksi pada akhir fase logaritmik atau awal fase stasioner dari tahap pertumbuhan suatu bakteri.



Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* dalam media MRS cair yang diinkubasi pada *rotary shaker* (suhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm).

4.2 Hasil Uji Antagonis Senyawa Antimikrobia Yang Dihasilkan Oleh *Lactobacillus acidophilus* terhadap *Escherichia coli*

Hasil uji antagonis senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* (dalam bentuk *Cell Free Supernatant*) terhadap *Escherichia coli* dengan metode *Agar Well Diffusion* pada media NA, menunjukkan terbentuknya zona hambat. Rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk adalah sebesar 6,91 mm (Gambar 4.2 B). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* mempunyai kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Pada akhir fase logaritmik, supernatan bakteri *Lactobacillus acidophilus* mempunyai pH 3,9 dengan kandungan total asam sebesar 1,24%. Hal tersebut mengindikasikan bahwa bakteri menghasilkan metabolit berupa asam, karena dapat menurunkan pH media yang awalnya 7 (netral) menjadi 3,9 (asam).



Gambar 4.2. Hasil uji antagonis senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* terhadap *Escherichia coli*

Keterangan :

A). Kontrol : Penambahan MRS cair tanpa bakteri (steril) ke dalam sumuran

B). Perlakuan : Penambahan CFS ke dalam sumuran

* Tanda panah menunjukkan terbentuknya zona hambat.

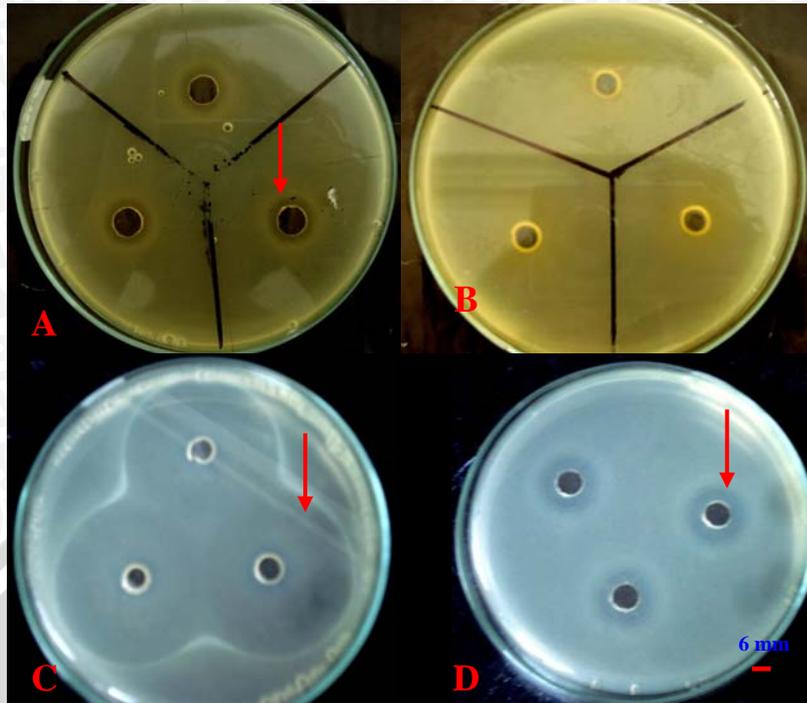
Kemampuan *Lactobacillus acidophilus* dalam menghasilkan senyawa antimikrobia juga dilakukan pada penelitian Coconnier dkk. (1997), yang menggunakan *Lactobacillus acidophilus* strain LB.

Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa supernatan *Lactobacillus acidophilus* mampu menghambat pertumbuhan beberapa bakteri patogen, diantaranya *Escherichia coli*.

4.3 Hasil Deteksi Golongan Senyawa Antimikrobia (Asam atau Bakteriosin) yang dihasilkan *Lactobacillus acidophilus*

Hasil uji antagonis CFS *Lactobacillus acidophilus* yang pHnya telah diatur menjadi 7 terhadap bakteri *Escherichia coli* menunjukkan tidak terbentuknya zona hambat (Gambar 4.3 B). Hal ini mengindikasikan bahwa penghambatan bakteri uji tidak terjadi karena protein (bakteriosin). Hasil uji antagonis yang dibandingkan dengan perlakuan pada pH awal yaitu 3,9 (asam) menunjukkan terbentuknya zona hambat, sehingga aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri uji diduga hanya terjadi karena aktivitas asam yang dihasilkan (asam laktat). Hasil tersebut dikonfirmasi dengan uji penghambatan menggunakan asam laktat 90% (p.a) dan asam laktat yang diencerkan sesuai dengan kandungan total asam yang terdapat pada CFS yakni 1,24%. Konfirmasi tersebut bertujuan untuk menguatkan dugaan bahwa asam laktat berperan atau mempunyai kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Hasil konfirmasi menunjukkan bahwa asam laktat konsentrasi 1,24% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 8,32 mm (Gambar 4.3 D). Adanya perbedaan diameter zona hambat pada perlakuan dengan CFS (6,91 mm) dan asam laktat (p.a) 1,24% (8,32 mm) menunjukkan bahwa kemampuan asam laktat yang terkandung dalam CFS belum optimal, karena asam laktat dalam CFS masih terdapat dalam bentuk *crude supernatant* atau belum dilakukan pemurnian, sehingga aktivitasnya berbeda dengan asam laktat yang sudah dimurnikan.

Hasil pengujian *Lactobacillus acidophilus* dalam memfermentasi gula menunjukkan bahwa, di dalam tabung Durham tidak terdapat gas atau karbon dioksida (gambar pada Lampiran 5), sehingga bakteri ini tergolong homofermentatif. Pengujian ini bertujuan untuk memperkuat dugaan bahwa bakteri tersebut tergolong homofermentatif, dimana 85% hasil akhir fermentasi gula adalah asam laktat (O'Keeffe dan Hill, 1999).



Gambar 4.3 Hasil uji antagonis CFS *Lactobacillus acidophilus* dan asam laktat (p.a) terhadap *Escherichia coli*

Keterangan :

- A).Penambahan CFS pH 3,9 (Rata-Rata diameter zona hambat 6,91mm)
- B).Penambahan CFS pH 7 (Tidak terbentuk zona hambat)
- C).Penambahan Asam Laktat 90% (p.a) (Rata-rata diameter zona hambat 37,6 mm)
- D).Penambahan Asam Laktat 1,24% (p.a) (Rata-rata diameter zona hambat 8,32 mm)

* Tanda panah menunjukkan terbentuknya zona hambat

Menurut Skrivanova dkk. (2006) dan Presser dkk. (1997), asam laktat dapat mempengaruhi pertumbuhan beberapa bakteri patogen, diantaranya *Escherichia coli*. Asam laktat yang belum mengalami disosiasi (pelepasan ion) dapat memasuki membran sel bakteri uji sehingga menimbulkan kondisi asam di dalam sitoplasma dan

mengganggu potensial membran dimana terjadi mekanisme pelepasan kelebihan proton keluar membran yang menggunakan energi dari ATP sehingga mengakibatkan sel kehabisan energi dan menyebabkan kematian sel. Konsentrasi asam laktat yang belum terdisosiasi yang diartikan sebagai jumlah konsentrasi total asam laktat dan banyaknya ion hidrogen (pH) merupakan faktor penting bagi terjadinya penghambatan pertumbuhan pada *Escherichia coli*.

Selain adanya aktivitas antimikrobia dari asam laktat yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus acidophilus* juga memiliki manfaat sebagai bakteri probiotik. Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang bila dikonsumsi dalam jumlah yang cukup dapat memberikan manfaat kesehatan diantaranya dapat meningkatkan keseimbangan mikroflora usus dan dapat menstimulasi sistem imun (Tannock, 1999; Adam dan Moss, 2000)

4.4 Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) Asam Laktat dari *Lactobacillus acidophilus* terhadap *Escherichia coli*

Uji *Minimum Inhibitory Concentration* dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terendah dari asam laktat yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus*, yang mempunyai kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Asam laktat (dalam bentuk CFS) berbagai konsentrasi, yaitu 25%, 20%, 15%, 12,5%, 10%, 5%, 2,5% dan 1% ditambahkan ke dalam masing-masing suspensi biakan *Escherichia coli* (3×10^5 sel/ml) yang ditumbuhkan dalam *Luria Bertani* cair. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* hingga 99,3% adalah penambahan CFS sebesar 12,5%. Hal ini sesuai dengan hasil penghitungan *Total Plate Count* dimana terdapat pengurangan jumlah sel dari 3×10^5 sel/ml menjadi 2×10^3 sel/ml. Hal ini menunjukkan nilai MIC asam laktat (dalam bentuk CFS) yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* terhadap *Escherichia coli* adalah sebesar 12,5% (Tabel 4.1).

Pada penambahan konsentrasi 15%, daya hambat asam laktat yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* mencapai 100%, dimana tidak terdapat pertumbuhan sel pada hasil penghitungan *Total Plate Count* dengan media NA. Hal ini menunjukkan bahwa pada penambahan konsentrasi sebesar 15%, asam laktat yang

dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* mampu membunuh semua bakteri uji yang terdapat dalam suspensi (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) penghitungan *Total Plate Count* (TPC) pada media NA

Konsentrasi CFS (%)	Jumlah sel awal (sel/ml)	Jumlah sel akhir (sel/ml)	Persentase Daya Hambat (%)
1	3×10^5	$6,3 \times 10^8$	Tidak Ada Penghambatan
2,5	3×10^5	$5,1 \times 10^8$	Tidak Ada Penghambatan
5	3×10^5	4×10^8	Tidak Ada Penghambatan
10	3×10^5	$3,5 \times 10^4$	88,3
12,5	3×10^5	2×10^3	99,3
15	3×10^5	0	100
20	3×10^5	0	100
25	3×10^5	0	100



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*, ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 6,91 mm. Golongan senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* yang berperan dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* diduga kuat merupakan aktivitas dari asam laktat. Konsentrasi terendah dari asam laktat (dalam bentuk *Cell Free Supernatant*) yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* yang mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* adalah sebesar 12,5% dan konsentrasi terendah dari asam laktat yang mampu membunuh *Escherichia coli* adalah sebesar 15%.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang aktivitas senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* terhadap bakteri Gram positif sehingga dapat diketahui spektrum penghambatannya. Perlu dilakukan pula deteksi jenis senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* secara lebih detail sehingga dapat diaplikasikan dengan maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, M. R dan M. O. Moss. 2000. Food Microbiology. Second Edition. Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- Appliedhealth. 2007. *Lactobacillus acidophilus*. <http://www.appliedhealth.com>. Tanggal Akses 26 Juni 2007.
- Benson, H. J. 2002. Microbiological Application Laboratory Manual In General Microbiology. Eighth Edition. Mc Graw Hill. Boston.
- Brooks, G.F., J.S. Butel dan S.A. Morse. 2001. Mikrobiologi Kedokteran. Ahli Bahasa : Eddy Mudihardi dkk. Salemba Medika. Jakarta.
- Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.H. Fleet dan M. Wooton. 1995. Ilmu Pangan. Penerjemah Hari Purnomo dan Adiono. UI Press. Jakarta
- Chen, H dan D.G Hoover. 2003. Bacteriocins and Their Food Application. Comprehensive Review in Food Science and Food Safety. Institute of Food Technologists. USA
- Coconnier, M.H., V. Lievin, M.F.B. Camard, S. Hudault dan A.L. Servin. 1997. Antibacterial Effect Of The Adhering Human *Lactobacillus acidophilus* Strain LB. *American Society For Microbiology*. 41 (5) : 1046-1052.
- Cowan, M.M. 1999. Plant Product As Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (4) : 564-583
- Fardiaz, S. 1993. Analisis Mikrobiologi Pangan. Penerbit PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Hamasaki, Y., Ayaki, M., Fuchu, H., Sugiyama, M dan Moripa, H. 2002. Behavior of Psychrotrophic Lactic Acid Isolated From

Spoiling Cooked Meat Products. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (6) : 3668-3671.

Hidayat, N., M.C. Padaga, S. Suhartini. 2006. Penerbit Andi. Yogyakarta.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley dan S.T. William. 2000. Bergeys Manual Of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Lippincott William and Wilkins. Baltimore.

Ingraham, J.L dan C.A. Ingraham. 2004. Introduction to Microbiology : A Case History Approach. Third Edition. Thomson Brooks-Cole. Canada.

Jack, R. W., J.R. Tagg dan B. Ray. 1995. Bacteriocin of Gram Positive Bacteria. *Microbiol. Rev.* 59:171-200

Jordan, S. L., J. Glover, L. Malcolm, F. M. Thomson-Carter, I. R. Booth, and S. F. Park. 1999. Augmentation of killing of *Escherichia coli* O157 by combinations of lactate, ethanol, and low-pH conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1308-1311

Madigan, M.T., J.M. Martinko dan J. Parker. 2003. Brock Biology of Microorganisms. Tenth Edition. Pearson Education Inc. USA.

O'Keeffe, T. dan C. Hill. 1999. Bacteriocins: Potential in Food Preservation. Academic Press. Ireland

Oscariz, J.C dan A.G. Pisabarro. 2001. Classification and Mode of Action of Membrane Active Bacteriocins Produced By Gram Positive Bacteria. *Int. Microbiol.* 4 : 13-19.

Pal, V., M. Jamuna dan K. Jeevaratnam. 2005. Isolation and Characterization of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria from A South Indian Special Dosa (Appam) Batter. National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures. Bulgaria

- Presser, K. A., D. A. Ratkowsky dan T. Ross. 1997. Modelling the Growth Rate of *Escherichia coli* as a Function of pH and Lactic Acid Concentration. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (6) : 2355-2360
- Price, R.J dan J.S. Lee. 1970. Inhibition of *Pseudomonas sp* by Hydrogen Peroxide Producing Lactobacilli. *J. Milk Food Technol*. 33 : 13
- Rattanachaikunsopon, P dan P. Phumkhachorn. 2000. A Bacteriocin Produced By *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolated From Thai Fermented Food. *Science Asia*. 26 : 195-200.
- Ray, B. 2000. Fundamental Food Microbiology. 2nd Edition. CRC Press. London. New York
- Ray, B dan M. Daeschel. 1992. Food Biopreservatives of Microbial Origin. CRC Press. Boca Raton. London. Tokyo.
- Renggana, S. 1979. Manual Of Analysis Of Fruit And Vegetable Product. Tata McGraw Hill Publishing Co Limited. New Delhi.
- Saifudin, M.R dan D. Astuti. 2005. Kombinasi Media Filter Untuk Menurunkan Kadar Besi (Fe). *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*. 6 (1) : 49-64.
- Savagodo, A., C.A.T. Ouattara, I.H.N. Bassole dan A.S. Traore. 2004. Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. *Pakistan Journal of Nutrition*. 3 (3) : 174-179
- Skrivanova, E., M. Marounek, V. Benda dan P. Brezina. 2006. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* and *Clostridium perfringens* To Organic Acid And Monolaurin. *Veterinarni Medicina*. 51 (3) : 81-88
- Sudarmadji, S. 1989. Mikrobiologi Pangan. PAU-UGM. Yogyakarta.

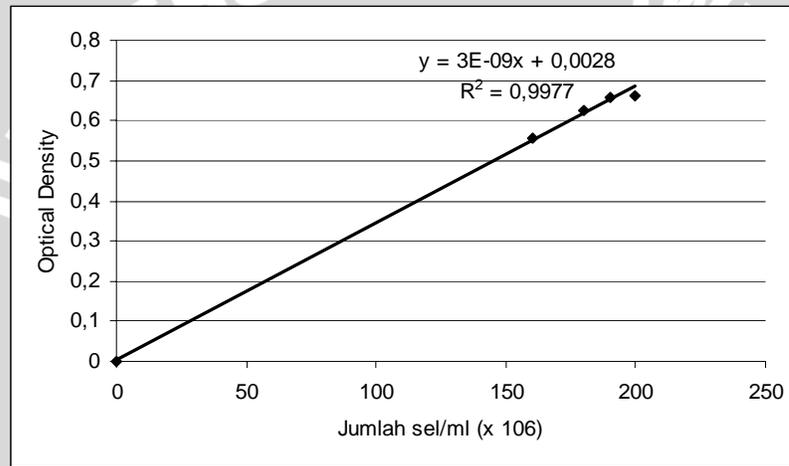
- Sukanto, Sunarto dan Muslikhah. 2001. Daya Antibakteri Ekstrak Tempe Kedelai Slamet Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus* BU 5, *Rhizopus oryzae* dan Kombinasinya Terhadap *Escherichia coli*. Journal. Fakultas Biologi Universitas Jendral Soedirman. Purwokerto.
- Tagg, J.R. dan A.R. Mc Given. 1971. Assay System for Bacteriocins. *Applied Microbiology*. 21 (5) : 943
- Tannock, G. W. 1999. Probiotics: A Critical Review. Horizon Scientific Press. Nortfolk.
- Tortora, G.J., B.R. Finke dan C.L. Case. 2001. Microbiology : An Introduction. Seventh Edition. Addison Wesley Longman, inc. New York.
- Todorov, S.D dan L.M.T. Dicks. 2005. Optimation of Bacteriocin ST311LD Production by *Enterococcus faecium* ST311LD, Isolated From Spoiled Black Olives. *The Journal of Microbiology*. 43 (4) : 370-373
- Todorov, S., M. Vas-Velho dan L.M.T. Dicks. 2003. Isolation and Partial Characterization of Bacteriocins Produced By Lactid Acid Bacteria Isolated From Traditional South African Beer. *EJEAFCh*. 2 (4) : 525-530.
- Volk, W.A. 1993. Basic Microbiology. Seventh Edition. Harper Collins Publishing. New York.
- Wardlow, G.M. 1999. Perspectives in Nutrition. Mc Graw Hill Company Inc. Boston
- WHO. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en>. Tanggal Akses 26 Juni 2007.
- Yousef, A.E dan C. Carlstrom. 2003. Food Microbiology : A Laboratory Manual. Willey-Interscience. New York.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Kurva standar *Lactobacillus acidophilus*

Tabel 1. Hasil Pengukuran Kurva Standar *Lactobacillus acidophilus*

Perbandingan Media Steril:Inokulum	Jumlah sel/ml	Optical Density
1:0	0	0
1:1	7×10^7	
1:2	$1,3 \times 10^8$	
1:3	$1,6 \times 10^8$	0,555
1:4	$1,8 \times 10^8$	0,627
1:5	2×10^8	0,662
1:6	$1,9 \times 10^8$	0,659



Gambar 1. Kurva Standar bakteri *Lactobacillus acidophilus*

Lampiran 2. Data Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*

Tabel 2. Hasil Pengukuran Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*

Waktu (Jam)	Optical Density	Jumlah sel/ml
1	0,013	$3,4 \times 10^6$
2	0,021	$6,1 \times 10^6$
3	0,04	$1,2 \times 10^7$
4	0,083	$2,7 \times 10^7$
8	0,404	$1,3 \times 10^8$
12	1,196	$3,9 \times 10^8$
16	1,72	$5,7 \times 10^8$
20	2,083	$6,9 \times 10^8$
24	2,227	$7,4 \times 10^8$
28	2,313	$7,7 \times 10^8$
32	2,352	$7,8 \times 10^8$
36	2,373	$7,9 \times 10^8$
40	2,373	$7,9 \times 10^8$
44	2,324	$7,7 \times 10^8$
48	2,325	$7,7 \times 10^8$

Lampiran 3. Hasil Uji Antagonis Senyawa Antimikrobia *Lactobacillus acidophilus*

Tabel 3. Hasil uji antagonis senyawa antimikrobia yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus* terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan metode *Agar Well Diffusion*

Ulangan	Replika	Diameter zona hambat (mm)
1	1	6,6
	2	6,7
	3	6,81
2	1	7,13
	2	7,14
	3	7,32
3	1	6,51
	2	6,91
	3	7,11
	Rata-Rata	6,91

Rumus diameter zona hambat = (A+B)-B(3)

Keterangan : A = Diameter Zona Bening

B = Diameter Sumuran (6 mm)



Lampiran 4. Hasil uji MIC dan MBC

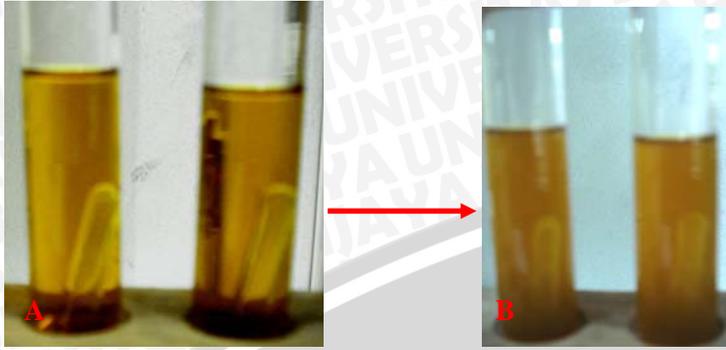
Tabel 4. Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) melalui pengukuran *Optical density* λ 600 nm dan penghitungan *Total Plate Count* (TPC)

Kons CFS	Ula-ngan	OD awal	OD akhir	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	cfu/ml	jumlah sel/ml
1%	1	0.006	1.133				TBUD	TBUD	33	5	$3,3 \times 10^8$	$6,3 \times 10^8$
							TBUD	TBUD	27	4		
	2	0.005	0.946				TBUD	TBUD	105	11	$9,3 \times 10^8$	
							TBUD	TBUD	80	6		
2.5%	1	0.006	1.033				TBUD	TBUD	56	7	$5,5 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$
							TBUD	TBUD	54	6		
	2	0.007	0.980				TBUD	TBUD	55	6	$4,7 \times 10^8$	
							TBUD	TBUD	39	5		
5%	1	0.003	0.950				TBUD	TBUD	48	10	$4,6 \times 10^8$	4×10^8
							TBUD	TBUD	43	4		
	2	0.004	1.474				TBUD	TBUD	35	3	$3,4 \times 10^8$	
							TBUD	TBUD	33	3		
10%	1	0.003	0.003	TBUD	44	2					$3,8 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$
				TBUD	31	1						
	2	0.003	0.003	TBUD	33	0					$3,3 \times 10^4$	
				TBUD	32	2						
12.5%	1	0.004	0.004	27	4	0					$1,9 \times 10^3$	2×10^3
				12	1	0						
	2	0.004	0.004	24	2	0					$2,1 \times 10^3$	
				18	2	0						

Lanjutan Tabel 4. Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) melalui pengukuran *Optical density* λ 600 nm dan penghitungan *Total Plate Count* (TPC)

Kons CFS	Ula-ngan	OD awal	OD akhir	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	cfu/ml	jumlah sel/ml
15%	1	0.004	0.004	0	0	0					0	0
				0	0	0						
	2	0.005	0.005	0	0	0					0	
				0	0	0						
20%	1	0.006	0.006	0	0	0					0	0
				0	0	0						
	2	0.008	0.008	0	0	0					0	
				0	0	0						
25%	1	0.005	0.004	0	0	0					0	0
				0	0	0						
	2	0.006	0.005	0	0	0					0	
				0	0	0						

Lampiran 5. Gambar Hasil Uji Fermentasi Gula (Pembentukan Gas) Pada *Lactobacillus acidophilus*

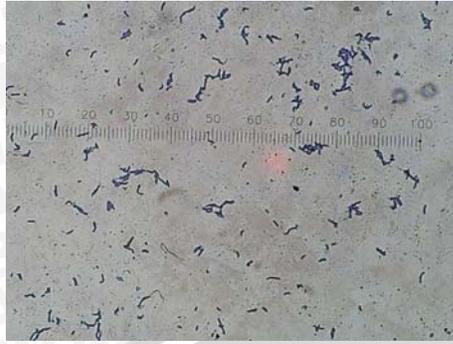


Gambar 2. Foto uji fermentasi gula (pembentukan gas) pada *Lactobacillus acidophilus*

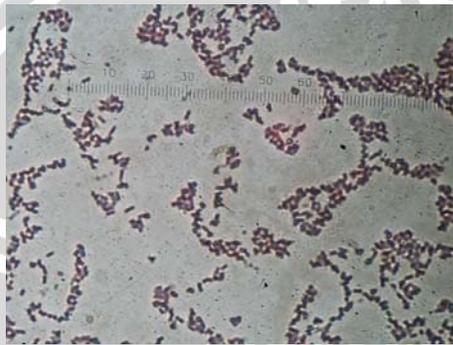
Keterangan :

- A). Sebelum Inkubasi
- B). Sesudah inkubasi 48 jam pada *rotary shaker* kecepatan 120 rpm, suhu 37°C (tidak terbentuk gas dalam tabung Durham)

Lampiran 6. Hasil Pewarnaan Gram *Lactobacillus acidophilus* dan *Escherichia coli*



Gambar 3. Hasil Pewarnaan Gram *Lactobacillus acidophilus* (perbesaran 1000x)

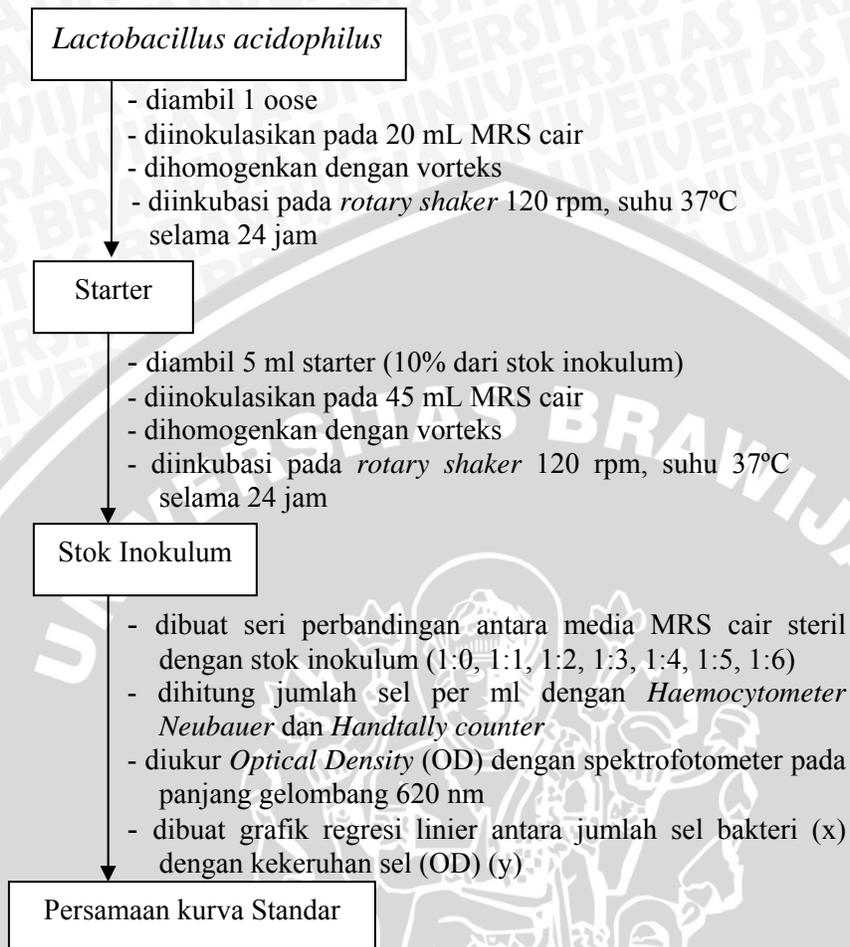


Gambar 4. Hasil Pewarnaan Gram *Escherichia coli* (perbesaran 1000x)



Lampiran 7. Diagram Alir Metode Penelitian

7.1 Pembuatan Kurva Standar *Lactobacillus acidophilus*



7.2 Diagram Alir Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*

Stok Inokulum

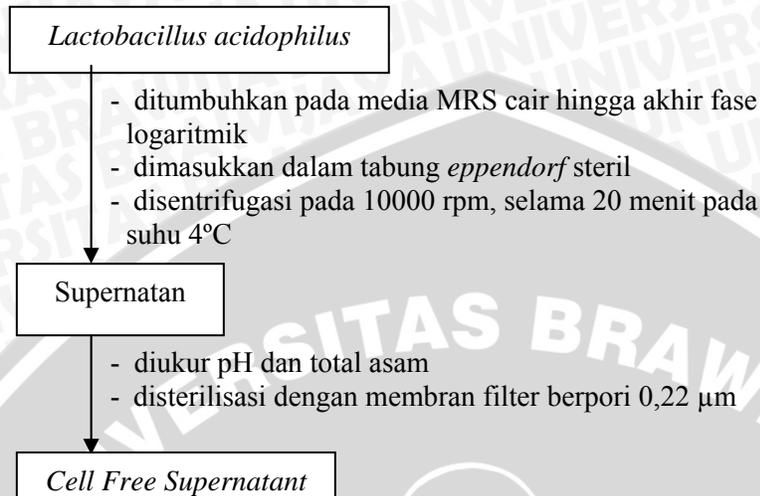
- diambil 10% stok inokulum (2×10^7 sel/mL)
- diinokulasikan pada 120 mL media MRS cair
- dihomogenkan dengan vorteks
- diinkubasi pada *rotary shaker* 120 rpm, suhu 37°C
- diukur *Optical Density* λ 620 nm setiap jamnya hingga jam keempat kemudian tiap 4 jam selama 48 jam
- dikonversikan nilai yang diperoleh ke jumlah sel per ml dengan menggunakan persamaan kurva standar jumlah sel bakteri

Kurva Pertumbuhan

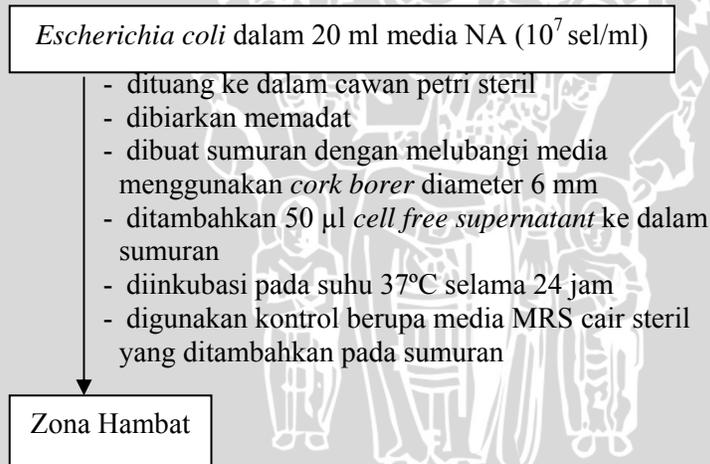


7.3. Diagram Alir Uji Antagonis Senyawa Antimikrobia Yang Dihasilkan Oleh *Lactobacillus acidophilus* terhadap *Escherichia coli*

7.3.1 Persiapan Larutan *Cell Free Supernatant* (CFS) *Lactobacillus acidophilus*



7.3.2 Uji Antagonis Senyawa Antimikrobia (CFS) yang Dihasilkan Oleh *Lactobacillus acidophilus* terhadap *Escherichia coli*



7.4 Deteksi Golongan Senyawa Antimikrobia (Asam atau Protein) yang dihasilkan *Lactobacillus acidophilus*

Escherichia coli dalam 20 ml media NA (10^7 sel/ml)

- dituang ke dalam cawan petri steril
- dibiarkan memadat
- dibuat sumuran dengan melubangi media menggunakan *cork borer* diameter 6 mm
- ditambahkan 50 μ l *cell free supernatant* pH 7 ke dalam sumuran
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- digunakan kontrol berupa CFS pH awal yaitu 3,9 yang ditambahkan pada sumuran

Zona Hambat

7.5 Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*)

Suspensi *Escherichia coli* dalam media LB cair (3×10^5 sel/ml)

- ditambahkan *Cell Free Supernatant* dengan konsentrasi akhir 25%, 20%, 15%, 12.5%, 10%, 5%, 2.5% dan 1%
- dihomogenkan menggunakan vorteks

Suspensi

- diukur *Optical Density* λ 600 nm (OD awal)
- diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C
- diambil 0,1 ml untuk dilakukan penghitungan *Total Plate Count*
- diukur *Optical Density* λ 600 nm (OD awal)

Hasil