

SKRIPSI

**DAYA ANTIBAKTERI SUPERNATAN ISOLAT
Bacillus subtilis DARI TANAH TERHADAP BAKTERI
Aeromonas hydrophila DAN *Staphylococcus aureus*
SECARA *IN VITRO***



Oleh

MADYA ADI WASKITA

NIM 060911011

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2013**

**DAYA ANTIBAKTERI SUPERNATAN ISOLAT *Bacillus subtilis* DARI
TANAH TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila* DAN
Staphylococcus aureus SECARA *IN VITRO***

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
Pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh
MADYA ADI WASKITA
NIM 060911011

Menyetujui
Komisi Pembimbing,

(Erni Rosilawati Sabar Iman, drh., M.S.)
Pembimbing Utama

(Dr. Mirni Lamid, drh., MP.)
Pembimbing Serta

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

Daya Antibakteri Supernatan Isolat *Bacillus subtilis* dari Tanah Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* Secara *in vitro*

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga 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.

Surabaya, 15 Agustus 2013

Madya Adi Waskita
NIM. 060911011

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 30 Juli 2013


KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Sri Chusniati, drh., M. Kes.
Sekretaris : Dr.A.T.Soelih Estoepangestie., drh.
Anggota : Hasutji Endah Narumi., drh., M.P.
Pembimbing Utama : Erni Rosilawati Sabar Iman, drh., M.S.
Pembimbing Serta : Dr. Mirni Lamid, drh., MP.

Telah diuji pada
Tanggal: 02 Agustus 2013

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Sri Chusniati, drh., M. Kes.
Anggota : Dr. A. T. Soelih Estoepangestie., drh.
: Hasutji Endah Narumi., drh., M.P.
: Erni Rosilawati Sabar Iman, drh., M.S.
: Dr. Mirni Lamid, drh., MP.



Surabaya, 15 Agustus 2013
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,

Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph. D., drh
NIP. 195312161978062001

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SUPERNATANT OF *Bacillus subtilis*
SOIL ISOLATE AGAINST *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus
aureus* (IN VITRO)**

Madya Adi Waskita

Abstract

The aim of this research was to know the antibacterial activity (*Minimum Inhibitory Concentration* and *Minimum Bactericidal Concentration*) of supernatant of *Bacillus subtilis* soil isolate against *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* and compare the antibacterial activity both of them. Antibacterial compound from *B. subtilis* are subtilin, subtilosin A, TasA, sublancin, circulin, polymixin and colistin which effective against Gram positive and Gram negative bacteria. Microdilution method use for the assessment of antibacterial activity to determined MIC and MBC. Concentration range was from 100% - 10%. The result showed the range of MIC against *Aeromonas hydrophila* were 60% - 70% and MBC were 70% - 80%. The range of MIC against *Staphylococcus aureus* were 80% - 90% and MBC were 90% - 100%. Statistical analyzed showed that there were highly significant difference among of antibacterial activity both *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords : *Bacillus subtilis*, MIC, MBC, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Kehadirat Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Daya Antibakteri Supernatan isolat *Bacillus subtilis* dari Tanah Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* Secara *in vitro*.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., PhD atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Erni Rosilawati Sabar Iman, drh., M.S. selaku pembimbing utama sekaligus ketua penelitian dan Dr. Mirni Lamid, drh., MP. selaku pembimbing serta atas saran dan bimbingannya sampai dengan selesainya skripsi ini.

Sri Chusniati, drh., M.Kes. selaku ketua penguji, Dr.A.T.Soelih Estoepangestie.,drh. selaku sekretaris penguji dan Hasutji Endah Narumi., drh., M.P. selaku anggota penguji.

Ajik Azmijah, drh.,SU selaku dosen wali yang selama ini telah memberikan bimbingan perwalian selama menempuh kuliah.

Seluruh staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Mas Deni dan Bapak Sugiri selaku petugas di Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas bantuan teknis dalam proses penelitian ini.

Kedua orangtuaku tercinta Ayahanda Jahuri dan Ibunda Siti Sulastri yang telah memberikan nasehat, bimbingan, motivasi, semangat dan doa yang tak pernah putus dalam penyusunan skripsi ini. Kakakku Peni Perdani Juliningrum yang selalu memberikan dukungan penuh dalam penyusunan skripsi ini.

Rifa Ernitawati atas segala dukungan, pengertian, motivasi, semangat dan doa dalam penyusunan skripsi ini. Teman satu penelitian Elyza N.F. atas segala semangat, pengertian, motivasi dan kerjasama yang kuat dalam menyelesaikan penelitian untuk penyusunan skripsi ini. Sahabat saya Ahmad Zaenuri, Yusron, Daus , Giar, Afi, Defri, Edwin dan Aziz atas segala dukungan dan semangat kepada penulis dalam penyusunan skripsi. Teman-teman kelas A yang selalu memberikan semangat dan motivasi selama kuliah serta teman-teman angkatan 2009 yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini.

Penulis sepenuhnya menyadari masih banyak terdapat kekurangan, mengingat terbatasnya pengetahuan dan kemampuan yang penulis miliki oleh karena itu saran dan kritik yang sifatnya membangun sangat penulis harapkan.

Surabaya, Juli 2013

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	i
HALAMAN PERNYATAAN	ii
HALAMAN IDENTITAS	iii
ABSTRACT	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Landasan Teori	3
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Hasil Penelitian	5
1.6 Hipotesis	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Bacillus subtilis</i>	6
2.1.1 Taksonomi <i>Bacillus subtilis</i>	6
2.1.2 Morfologi <i>Bacillus subtilis</i>	6
2.1.3 Sifat Biakan dan Biokimia <i>Bacillus subtilis</i>	7
2.1.4 Habitat dan Ekologi <i>Bacillus subtilis</i>	8
2.1.5 Resistensi	8
2.2 Tinjauan Probiotik	9
2.3 Bakteri Patogen	10
2.3.1 <i>Aeromonas hydrophila</i>	10
2.3.1.1 Taksonomi <i>Aeromonas hydrophila</i>	10
2.3.1.2 Morfologi <i>Aeromonas hydrophila</i>	10
2.3.1.3 Patogenesis dan Gejala Klinis Infeksi <i>Aeromonas hydrophila</i>	11
2.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.3.2.1 Taksonomi <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.3.2.2 Morfologi <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.3.2.3 Patogenesis dan Gejala Klinis Infeksi <i>Staphylococcus aureus</i>	13

BAB 3 MATERI DAN METODE	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.2 Bahan Penelitian	15
3.3 Alat Penelitian	16
3.4 Metode Penelitian	16
3.5 Tahapan Penelitian	16
3.5.1 Sterilisasi Alat	16
3.5.2 Re-identifikasi <i>Bacillus subtilis</i>	16
3.5.3 Pelaksanaan Penelitian	17
3.5.3.1 Produksi Supernatan <i>Bacillus subtilis</i>	17
3.5.3.2 Uji Daya Antibakteri	17
3.6 Variabel Penelitian	18
3.6.1 Variabel Bebas	18
3.6.2 Variabel Tergantung	18
3.6.3 Variabel Kontrol	18
3.7 Peubah Yang Diamati	19
3.8 Analisis Data	19
KERANGKA PENELITIAN	20
BAB 4 HASIL PENELITIAN	
4.1 Daya Antibakteri Supernatan <i>Bacillus subtilis</i> (MIC dan MBC)	21
BAB 5 PEMBAHASAN	
5.1 Daya Antibakteri Supernatan <i>Bacillus subtilis</i> (MIC dan MBC)	24
5.2 Perbedaan Daya Antibakteri Supernatan <i>Bacillus subtilis</i> terhadap <i>Aeromonas hydrophila</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>	25
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1 Kesimpulan	28
6.2 Saran	28
RINGKASAN	29
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Gambaran mikroskopis <i>Bacillus subtilis</i>	7
2.2 Gambaran mikroskopis <i>Aeromonas hydrophila</i>	11
2.3 Gambaran mikroskopis <i>Staphylococcus aureus</i>	13
4.1 Hasil MIC supernatan <i>Bacillus subtilis</i>	21
4.2 Hasil MBC supernatan terhadap <i>Aeromonas hydrophila</i>	22
4.3 Hasil MBC supernatan terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	22
5.1 Struktur dinding sel bakteri Gram negatif dan Gram positif...	25



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Hasil MIC dan MBC supernatan <i>Bacillus subtilis</i> terhadap bakteri indikator	22
4.2 Hasil pengamatan MIC dan MBC daya antibakteri supernatan isolat <i>Bacillus subtilis</i> terhadap <i>Aeromonas hydrophila</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>	23



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Tabel hasil MIC dan MBC	36
2. Analisis <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> dengan <i>t Test</i> ...	37
3. Analisis <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> dengan <i>t Test</i> ...	38
4. Pembuatan <i>Mueller Hinton Agar</i> (MHA)	39
5. Pembuatan Media <i>Manitol Salt Agar</i> (MSA)	40
6. Pemeriksaan Mikroskopis dengan Pewarnaan Gram	41
7. Pemeriksaan Produksi Katalase	42
8. Pemeriksaan VP (<i>Voges-Proskauer</i>)	43
9. Pemeriksaan produksi enzim urease	44
10. Pemeriksaan SIM (<i>Sulfide Indol Motility</i>)	45
11. Pemeriksaan Sitrat	46
12. Pemeriksaan Hidrolisis <i>Starch</i>	47
13. Tabel McFarland Nephelometer Standard	48
14. Gambar Hasil Penelitian, Alat dan Bahan	
Gambar 1. <i>Bacillus subtilis</i> secara makroskopis	49
Gambar 2. <i>Bacillus subtilis</i> secara mikroskopis.....	49
Gambar 3. Hasil uji VP	50
Gambar 4. Hasil uji starch	50
Gambar 5. Hasil uji urea	50
Gambar 6. Hasil uji SIM	51
Gambar 7. Hasil uji sitrat	51
Gambar 8. Hasil uji katalase	51
Gambar 9. <i>Aeromonas hydrophila</i> secara makroskopis	52
Gambar 10. <i>Aeromonas hydrophila</i> secara mikroskopis	52
Gambar 11. <i>Staphylococcus aureus</i> secara makroskopis.....	52
Gambar 12. <i>Staphylococcus aureus</i> secara mikroskopis.....	53
Gambar 13. Penyesuaian suspensi bakteri dengan standard McFarland 0,5	53
Gambar 14. Alat yang digunakan untuk metode mikrodilusi ...	54
Gambar 15. Alat-alat penelitian	54
Gambar 16. Bahan pewarnaan Gram	54
Gambar 17. Hasil MBC kontrol positif terhadap <i>Aeromonas hydrophila</i>	55
Gambar 18. Hasil MBC kontrol positif terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	55

DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

ATCC	: American Type Culture Collection
BHI	: Brain Heart Infussion
DNA	: Deoxyribonucleic acid
FLU	: Flumequine
GALT	: Gut Associated Lymphoid Tissue
H ₂ O ₂	: Hydrogen Peroxide
MR	: Methyl Red
MHA	: Mueller Hinton Agar
MSA	: Mannitol Salt Agar
MIC	: Minimum Inhibitory Concentration
MBC	: Minimum Bactericidal Concentration
NB	: Nutrient Broth
NaCl	: Natrium Klorida
OTC	: Oxytetracycline
rpm	: rotation per minute
SIM	: Sulfide Indol Motility
SCA	: Simmons Citrate Agar
VP	: Voges Proskouer
%	: persen
µl	: mikroliter
°C	: derajat Celcius
ml	: mililiter

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Infeksi merupakan keadaan masuknya mikroorganisme seperti bakteri, jamur, parasit dan virus ke dalam tubuh kemudian berkembang biak dan menimbulkan penyakit (Banu dan Yilmaz, 2009). Menurut Klerebezem *et al.*, (2004) penyakit infeksi yang disebabkan bakteri merupakan penyebab kematian yang paling besar pada hewan. Selain itu penyakit infeksi bakteri dapat mengakibatkan penurunan produksi pada hewan karena dapat menyebabkan gangguan kondisi tubuh.

Berbagai macam bakteri dapat menyebabkan penyakit infeksi seperti *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* (Gill *et al.*, 2000). Salah satu bakteri penyebab penyakit infeksi yaitu *Aeromonas hydrophila* yang bersifat Gram negatif sangat penting dalam dunia perikanan karena merupakan bakteri patogen yang sering menimbulkan kematian pada ikan. Menurut Poobalene (2008) kerugian yang diakibatkan oleh infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dalam dunia perikanan mencapai milyaran dollar karena menyebabkan kematian pada ikan yang ditandai dengan hemoragi, septicaemia dan ulserasi jaringan.

Beleneva (2011) menyatakan bahwa bakteri Gram positif seperti *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri patogen yang mengindikasikan adanya kontaminasi kebersihan air dan menyebabkan infeksi sekunder pada ikan. Infeksi *Staphylococcus aureus* yang terjadi pada ikan dapat menyebabkan gangguan organ seperti ginjal, limpa dan hepar (Hammad *et al.*, 2012).

Berbagai usaha penanggulangan penyakit infeksi yang disebabkan bakteri telah banyak dilakukan diantaranya adalah penggunaan antibiotik spektrum luas dan sempit, akan tetapi pemberian antibiotik dapat menimbulkan resistensi (Gaynor dan Mamkin, 2005). Jian Li *et al*, (2002) menyatakan perlu adanya alternatif pengobatan dalam penanggulangan penyakit infeksi yang disebabkan bakteri sehingga didapat produk yang bebas bakteri patogen dan residu antibiotik. Probiotik memberikan alternatif pengendalian bakteri patogen yang aman bagi lingkungan dan meningkatkan kesehatan hewan pada budidaya perairan (Balcazar *et al.*, 2006).

Terdapat beberapa genus bakteri yang dapat digunakan sebagai probiotik antara lain genus *Bacillus* yang merupakan bakteri yang menguntungkan dan dapat hidup berasosiasi sebagai flora normal pada organisme baik di dalam maupun diluar tubuh (Feliatra dan Suryani, 2004).

Bacillus subtilis merupakan salah satu bakteri dari genus *Bacillus* yang dapat digunakan sebagai probiotik karena merupakan bakteri yang tidak patogen. *Bacillus subtilis* dapat diisolasi dari berbagai lingkungan misalnya pada tanah dan akuatik (Earl *et al.*, 2008; Flores dan Guzman, 2009). *Bacillus subtilis* bersifat Gram positif, menghasilkan spora, motil, indol negatif, menghasilkan asam sitrat, katalase positif dan oksidasi positif (Awais *et al.*, 2007). *Bacillus subtilis* mempunyai aktivitas proteolitik dan menghasilkan antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif (Aslim *et al.*, 2002; Earl *et al.*, 2008). Bahan antibakteri yang terkandung di dalam supernatan *Bacillus subtilis* yaitu polymixin, colistin, circulin dan antibiotik peptid seperti

subtilin, subtilosin A, TasA dan sublancin (Leclere *et al.*, 2006; Awais *et al.*, 2010).

Salah satu pengujian bakteri agar dapat digunakan sebagai kandidat probiotik adalah dengan melakukan uji antagonis untuk mengetahui daya antibakteri terhadap bakteri patogen secara *in vitro* (Zaenab dkk., 2004). Penelitian ini menggunakan *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* yang bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan kepekaan pada bakteri yang bersifat Gram negatif dan Gram positif.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan pada latar belakang di atas maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

- 1) Bagaimana daya antibakteri supernatan (MIC dan MBC) isolat *B. subtilis* dari tanah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*?
- 2) Apakah terdapat perbedaan daya antibakteri supernatan isolat *B. subtilis* dari tanah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*?

1.3 Landasan Teori

Penyakit infeksi yang disebabkan bakteri merupakan penyebab kematian yang paling besar pada hewan. Selain itu penyakit infeksi bakteri dapat mengakibatkan penurunan produksi pada hewan karena dapat menyebabkan gangguan kondisi tubuh (Klereebezem *et al.*, 2004). *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri Gram negatif penyebab penyakit infeksi bakteri pada ikan yang dapat mengakibatkan septicaemia, hemoragi, ulcerasi dan menyebabkan

kontaminasi air. Penyakit infeksi yang disebabkan *Aeromonas hydrophila* dapat mengakibatkan penurunan yang signifikan pada produksi perikanan karena mengakibatkan mortalitas yang tinggi (Pachanawan, 2008). *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif yang dapat menyebabkan penyakit pada ikan dengan merusak organ ginjal, limpa, dan berperan sebagai bakteri penyebab infeksi sekunder pada ikan (Atyah *et al.*, 2010).

Penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif seperti *Aeromonas hydrophila* dan Gram positif seperti *Staphylococcus aureus* dapat diobati dengan antibiotika (Gill *et al.*, 2000). Menurut WHO (2008) penggunaan antibiotik terhadap suatu penyakit dapat menimbulkan resistensi, menimbulkan residu antibiotik dan pencemaran lingkungan.

Bacillus subtilis merupakan bakteri tidak patogen yang dapat diisolasi dari tanah dan menghasilkan antibakteri yang mampu menghambat bakteri Gram negatif dan Gram positif (Awais *et al.*, 2010). Supernatan *B. subtilis* mengandung polymixin, colistin, circulin dan antibiotik peptid seperti subtilin, subtilisin A, TasA dan sublancin yang mempunyai daya antibakteri terhadap bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif (Leclere *et al.*, 2006; Awais *et al.*, 2010). Perbedaan pada struktur dinding sel bakteri Gram positif yang terdiri atas lapisan tebal peptidoglikan dan Gram negatif yang terdiri atas 3 lapisan yaitu membran dalam, peptidoglikan tipis dan membran luar mempengaruhi daya antibakteri supernatan *B. subtilis* (Klereebezem *et al.*, 2004).

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

- 1) Mengetahui daya antibakteri supernatan (MIC dan MBC) isolat *B. subtilis* dari tanah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*.
- 2) Membandingkan daya antibakteri supernatan isolat *B. subtilis* dari tanah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* yang bersifat Gram negatif dan *Staphylococcus aureus* yang bersifat Gram positif.

1.5 Manfaat Hasil Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai kepekaan bakteri Gram negatif seperti *Aeromonas hydrophila* dan Gram positif seperti *Staphylococcus aureus* terhadap supernatan isolat *B. subtilis* dari tanah sebagai bahan antibakteri.

1.6 Hipotesis

Terdapat perbedaan daya antibakteri supernatan isolat *B. subtilis* dari tanah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* yang bersifat Gram negatif dan *Staphylococcus aureus* yang bersifat Gram positif.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Bacillus subtilis*

2.1.1 Taksonomi *Bacillus subtilis*

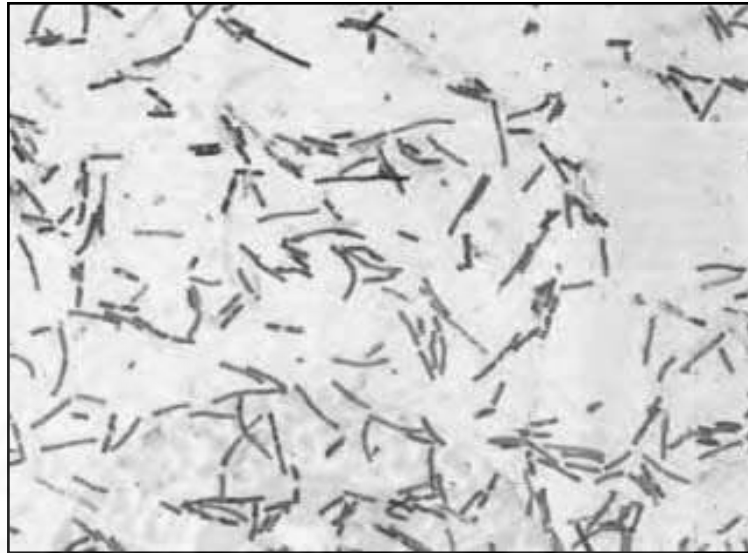
Taksonomi *Bacillus subtilis* menurut Fritze (2004) adalah:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicute
Class	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Family	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus subtilis</i>

2.1.2 Morfologi *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis merupakan bakteri dari genus *Bacillus* berbentuk batang, Gram positif, menghasilkan spora, motil, indol negatif, menghasilkan asam sitrat, katalase positif dan oksidasi positif (Awais *et al.*, 2010). Secara makroskopis koloni bakteri dapat berubah bentuk tergantung dari kondisi lingkungan seperti kondisi nutrisi dan variasi dari media. Perubahan morfologi koloni juga bergantung pada kemampuan gerakan sel yang aktif. Pertumbuhan koloni seperti cincin konsentris. Permukaan koloni pada agar berukuran kecil dengan tepi keriting. Pemukaannya berbentuk granular dan kusam. Secara mikroskopis *B. subtilis* berbentuk batang dengan panjang 3-4 μ m dan memiliki lebar 0,6-

0,8 μ m. Bakteri ini mempunyai flagella sehingga bersifat motil (Wakita *et al.*, 2010).



Gambar 2.1 Gambaran mikroskopis *Bacillus subtilis*
(Sumber: Cartwright, 2009).

2.1.3 Sifat Biakan dan Biokimia *Bacillus subtilis*

Sifat biakan dan biokimia *B. subtilis* yaitu anaerob, tumbuh pada NaCl 5%,-10 %, pH 5,7. Pada pemeriksaan biokimia, *Bacillus subtilis* memanfaatkan natrium sitrat sebagai sumber karbon untuk metabolisme dan pertumbuhan dengan menunjukkan pola difusi dari tes inokulasi tusukan positif yang menandakan adanya motilitas bakteri. Asam terbentuk dari glukosa, sukrosa dan maltosa, tidak membentuk indol dan sedikit menghasilkan H₂S, mereduksi nitrat (Logan dan Berkeley, 1984).

Bacillus subtilis mempunyai kemampuan untuk memproduksi enzim katalase, menghidrolisis karbohidrat serta memfermentasi sitrat. *Bacillus subtilis* mempunyai kemampuan menghidrolisis pati dengan menghasilkan enzim diastase

yang memecah ikatan antara molekul glukosa sehingga pati terhidrolisis (Kaiser, 2011).

2.1.4 Habitat dan Ekologi *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis dapat diisolasi dari berbagai lingkungan misalnya tanah dan akuatik serta dapat di isolasi dari saluran pencernaan ruminansia. *Bacillus subtilis* tumbuh dalam kondisi aerob dan dapat menghasilkan endospora. Spora ini mudah terbawa angin sehingga memungkinkan spora untuk bermigrasi dalam jarak jauh (Earl *et al.*, 2008). Endospora berfungsi untuk melawan kondisi lingkungan yang ekstrim terhadap pH, suhu dan kekurangan nutrisi. Keadaan ini membuat *B. subtilis* mampu berkembang dan beradaptasi pada bermacam-macam penyesuaian lingkungan (Nicholson, 2002).

2.1.5 Resistensi

Bacillus subtilis dapat dibekukan pada suhu -78 °C dengan menggunakan larutan gliserol dan dibekukan pada suhu -20 °C dengan media susu skim. *Bacillus subtilis* mampu membentuk endospora yang berfungsi sebagai ketahanan terhadap lingkungan. Endospora sangat tahan terhadap gangguan fisik dan kimia yang akan merusak sel bakteri dan melakukan pertahanan terhadap zat asing. Lapisan luar spora yang disebut spora coat mempunyai kemampuan pertahanan yang utama pada bakteri yang berfungsi melindungi spora aktif dari enzim, seperti lisozim dan melindungi dari gangguan mekanik serta melindungi spora dari beberapa bahan kimia seperti hidrogen peroksida (H₂O₂) (Riesenman dan Nicholson, 2000). Setelah kekurangan nutrisi atau dehidrasi, bakteri Gram positif

berdiferensiasi menjadi spora yang sangat tahan. *Bacillus subtilis* mampu merespon lebih cepat terhadap perubahan lingkungan seperti perubahan mendadak dalam suhu atau osmolaritas. *Bacillus subtilis* ditemukan di lapisan permukaan tanah dengan kondisi yang sering berubah (Peter dan Marahiel, 1999).

2.2 Tinjauan Probiotik

Definisi umum probiotik adalah mikroorganisme baik yang terdiri dari mikroba hidup yang dimasukkan ke dalam tubuh manusia atau hewan secara oral. Mikroba hidup itu diharapkan mampu memberikan pengaruh positif terhadap kesehatan manusia atau hewan dengan cara memperbaiki sifat-sifat yang dimiliki mikroba alami yang ada di dalam tubuh manusia atau hewan. Syarat-syarat probiotik adalah probiotik harus tetap dalam keadaan hidup, daya untuk bertahan hidup ketika melalui saluran pencernaan dan manfaat kesehatan yang dapat dibuktikan keberadaannya (Balcazar *et al.*, 2006).

Probiotik merupakan alternatif tindakan pengendalian sebagai antibiotik yang dapat diisolasi dari indigenous dan eksogenous dari tanah. Probiotik digunakan untuk mengontrol bakteri patogen yang dapat menyebabkan penyakit infeksi pada hewan (Balcazar *et al.*, 2006). *Bacillus* dapat bersifat termofilik, psikotrofilik, asidofilik, alkalifilik dan halotolerant. Sebagian besar dari antibiotik peptide diproduksi oleh genus *Bacillus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif (Awais *et al.*, 2007). *Bacillus subtilis* merupakan salah satu bakteri dari genus *bacillus* yang dapat digunakan sebagai probiotik (Cartwright, 2009).

Probiotik *B. subtilis* mempunyai kemampuan untuk menimbulkan respon imun. Immunostimulant akan disebarkan dari spora *B. subtilis* ke jaringan limfoid utama dari GALT (Payer's patch dan limfonodul mesenterika). *Bacillus subtilis* menghasilkan antibakterial antara lain polymyxin, difficidin, subtilin, mycobacillin, bacitracin (Awais *et al.*, 2010).

2.3 Bakteri Patogen

2.3.1 *Aeromonas hydrophila*

2.3.1.1 Taksonomi *Aeromonas hydrophila*

Taksonomi *Aeromonas hydrophila* menurut Holt *et al.*, (1994) adalah :

Filum	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Pseudanonadeles
Family	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Aeromonas</i>
Spesies	: <i>Aeromonas hydrophila</i>

2.3.1.2 Morfologi *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila merupakan bakteri yang bersifat Gram negatif, mempunyai morfologi batang pendek dengan ukuran bervariasi antara lebar 0,8 sampai 1,0 mikron dengan panjang 1,0 sampai 3,5 mikron, tidak memiliki spora, bakteri bersifat motil karena mempunyai flagela monotrichous. Morfologi koloni

permukaannya agak menonjol, berbentuk bulat, mengkilat, tepi koloni entire, diameter 2-3 mm (Austin dan Austin, 2007).



Gambar 2.2 Gambaran mikroskopis *Aeromonas hydrophila* (Sumber: Cipriano, 2001).

2.3.1.3 Patogenesis dan Gejala Klinis Infeksi *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila merupakan salah satu bakteri patogen yang menimbulkan *outbreak* penyakit pada ikan. *Aeromonas hydrophila* menginfeksi organ melalui saluran pencernaan ikan dan dapat terjadi melalui luka (Cipriano, 2001). Infeksi *A. hydrophila* ditandai dengan adanya ulcerasi, hemoragi dan nekrosis organ visceral yang menjadi gejala umum. Dalam keadaan akut, septicemia terjadi dengan cepat pada ikan. Ketika infeksi terjadi exophthalmia, ulcerasi kulit dan akumulasi cairan pada kulit dan menimbulkan terjadinya ascites (Austin dan Austin, 2007).

Periode inkubasi penyakit berdasarkan resistensi ikan, kondisi lingkungan dan iklim. Variasi periode inkubasi 2-4 hari dengan infeksi natural dan 8-48 jam dengan metode inkubasi laboratorium (Banu dan Yilmaz, 2009).

2.3.2 *Staphylococcus aureus*

2.3.2.1 Taksonomi *Staphylococcus aureus*

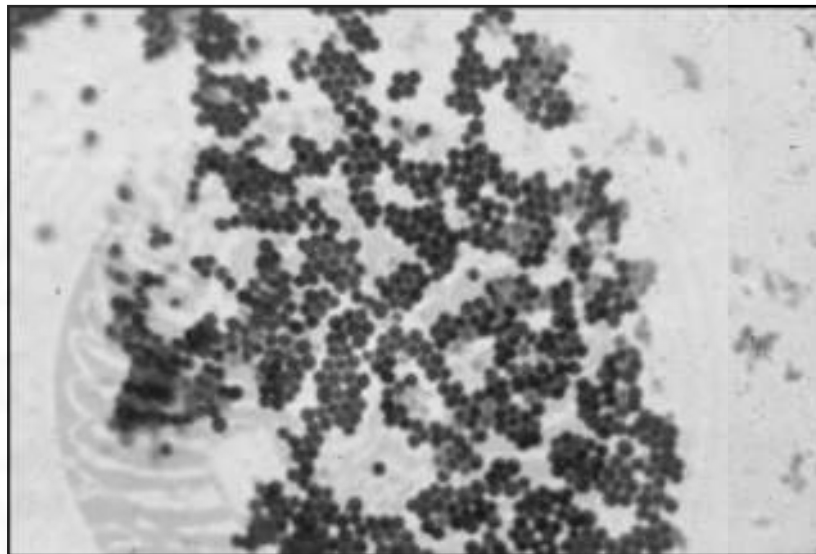
Klasifikasi *Staphylococcus aureus* menurut Dwijoseputro (1994) adalah:

Kingdom	: Monera
Filum	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Family	: Micrococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Species	: <i>Staphylococcus aureus</i>

2.3.2.2 Morfologi *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram Positif, non motil, tidak berspora, berbentuk kokus dan tersusun seperti buah anggur (Atyah *et al*, 2010). Apabila ditumbuhkan pada media agar, *Staphylococcus* memiliki diameter 0,5-1,0 mm dengan koloni berbagai warna dapat bervariasi antara lain putih, kuning dan oranye. Toksin yang dibentuk oleh *S. aureus* adalah haemolysin alfa, beta, gamma delta dan epsilon. Strain *S. aureus* yang berasal dari hewan biasanya menghasilkan α -hemolisin dan β -hemolisin (Hammad *et al.*, 2012). α -hemolisin biasanya juga dihasilkan oleh strain *S. aureus* yang berasal dari manusia. Toksin

lain ialah leukosidin, enterotoksin dan eksfoliatin. Enterotosin dan eksoenzim dapat menyebabkan keracunan makanan terutama yang mempengaruhi saluran pencernaan. Suhu optimum untuk pertumbuhan *S. aureus* adalah 35 °C – 37 °C dengan suhu minimum 6,7 °C dan suhu maksimum 45,4 °C. Bakteri ini dapat tumbuh pada pH 4,0 – 9,8 dengan pH optimum 7,0 – 7,5 (Islam *et al.*, 2008).



Gambar 2.3 Gambaran mikroskopis *Staphylococcus aureus* (Sumber: Atyah *et al.*, 2010).

2.3.2.3 Patogenesis dan Gejala Klinis Infeksi *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif yang berasal dari kulit dan membran mukosa hewan dan manusia. *Staphylococcus aureus* bukan merupakan flora normal pada ikan. Infeksi *S. aureus* pada ikan mengindikasikan adanya kontaminasi kebersihan air atau infeksi sekunder pada ikan (Hammad *et al.*, 2012).

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif yang menginfeksi ikan dengan menunjukkan gejala klinis seperti septicemia, endocarditis, renal carbuncle, arthritis septicemia, abses epidural. Spesifik sindrom dapat menyebabkan efek lokal maupun sistemik dan spesifik toksin. Infeksi *S. Aureus* dapat terjadi pada ikan yang dapat menyebabkan gangguan organ seperti ginjal, limpa dan hepar (Li dan Hu, 2012).

Staphylococcus aureus menghasilkan koagulase, suatu protein mirip enzim yang dapat menggumpalkan plasma yang telah diberi oksalat atau sitrat dengan bantuan suatu faktor yang terdapat dalam banyak serum. Bakteri yang membentuk koagulase dianggap mempunyai potensi menjadi patogen invasif (Ray, 2009).

BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2013 sampai Juli 2013 di Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan dan Laboratorium Proteomik Tropical Disease Center Universitas Airlangga Surabaya.

3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah 8 isolat *Bacillus subtilis* dari penelitian Susanti (2011) dan *Oxytetracycline* sebagai kontrol positif. Bakteri indikator yang digunakan untuk menguji daya antibakteri supernatan *B. subtilis* yaitu bakteri *Aeromonas hydrophila* dari penelitian Hendrawan (2013) dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 koleksi Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Bahan yang digunakan adalah aquadest steril, media *Manitol Salt Agar* (Oxoid SR14), media *Mueller Hinton Agar* (Oxoid CM377), *Nutrient Broth* (Oxoid CM1/2), gentian violet (C581), lugol (C10921), alkohol acetone (C1009), safranin (C967), media *Sulfide Indol Motility* (Oxoid CM435), media *Simmons Citrate Agar* (Oxoid CM155/156), media *Voges-Proskauer test* (Oxoid CM43), media *starch agar* (Criterion cat no. 7010), H₂O₂, media urease agar (Oxoid CM53/54) dan media BHI broth (Oxoid CM225/226).

3.3 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf (Memert), inkubator (Memert), timbangan, spuit, tabung Erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan Petri, ose bulat, pembakar bunsen, obyek glass, cover glass, pinset, mikroskop, filter membran 0,22 μm , mikroplate, mikropipet (Eppendorf), yellow tip, sentrifus (Beckman), rotary shaker (IKA) dan mikrotube 1,5 ml (Eppendorf).

3.4 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan metode mikrodilusi (Bailey dan Scott, 1986; Holowachuk *et al.*, 2003).

3.5 Tahapan Penelitian

3.5.1 Sterilisasi alat

Sterilisasi alat bertujuan untuk membunuh semua organisme termasuk spora. Dalam penelitian ini menggunakan autoklaf untuk melakukan sterilisasi. Suhu yang digunakan pada sterilisasi menggunakan autoklaf adalah 121°C selama 15 menit (Rosilawati dkk., 2010).

3.5.2 Re-identifikasi *Bacillus subtilis*

Sebanyak 8 isolat *B. subtilis* dari tanah ditanam pada media MSA kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam (Aslim *et al.*, 2002). Setelah 24 jam, dilihat hasil pertumbuhan dari koloni bakteri yang tumbuh. Bakteri yang memfermentasi *mannitol* ditunjukkan dengan perubahan warna media menjadi kuning. Kemudian melakukan identifikasi *B. subtilis* secara mikroskopik dengan

menggunakan pewarnaan Gram, terlihat *B. subtilis* berbentuk batang pendek dan Gram positif. Selanjutnya dilakukan uji biokimia meliputi uji *Sulfide Indol Motility* (SIM), uji *Simmons Citrate Agar* (SCA), uji *Voges-Proskouer* (VP), uji *starch*, uji katalase, uji urease (Awais *et al.*, 2007). Hasil re-identifikasi *B. subtilis* dapat dilihat pada lampiran 14.

3.5.3 Pelaksanaan Penelitian

3.5.3.1 Produksi Supernatan *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis sebanyak satu koloni dibiakkan pada media BHI broth diinkubasikan pada suhu 32°C selama 48 jam pada 125 cycles/menit di rotary shaker. Kultur *B. subtilis* di sentrifus pada 10.000 rpm dalam 15 menit. Supernatan disaring dengan menggunakan filter membran 0,22 µm. Hasil saringan dapat dievaluasikan sebagai agen antibakteri (Dhanapathi *et al.*, 2008; Hanina *et al.*, 2011).

3.5.3.2 Uji Daya Antibakteri

Uji daya antibakteri menggunakan metode mikrodilusi untuk mengetahui *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) (Bailey dan Scott, 1986; Holowachuk *et al.*, 2003). Konsentrasi yang digunakan mulai dari 100 % sampai 10 % supernatan *B. Subtilis*. Pada lubang pertama diisi 100 µl supernatan *B. subtilis*. Kemudian lubang selanjutnya diisi dengan supernatan *B. subtilis* dengan konsentrasi 90% sampai lubang ke 10 diisi dengan konsentrasi 10% supernatan *B. subtilis*. Sebagai kontrol positif menggunakan antibiotik *Oxytetracycline* dengan konsentrasi 100 %

sampai 10 % dengan cara yang sama. Selanjutnya masing-masing lubang diisi dengan suspensi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* sesuai dengan standard McFarland 0,5 sebanyak 50 µl, lalu inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam, untuk mengetahui MIC. Kemudian dari masing-masing lubang ditanam ke media padat *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan cara streak. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk melihat MBC (Zakaria *et al.*, 2010).

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*.

3.6.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah 8 isolat *B. subtilis* dari tanah yaitu :T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, dan T9.

3.6.3 Variabel Kontrol

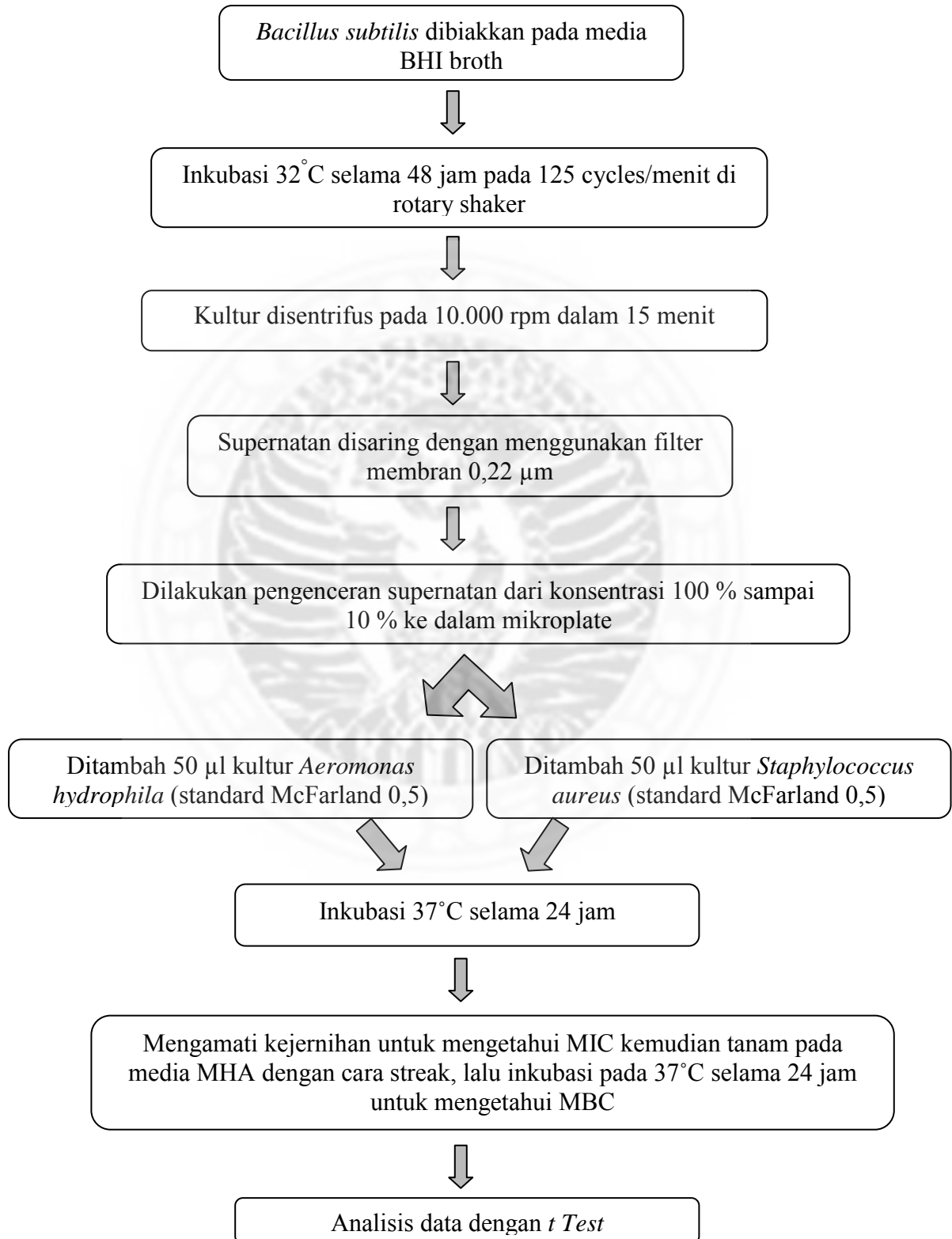
Variabel kontrol pada penelitian ini adalah media yang digunakan untuk isolasi (MSA), media identifikasi, media yang digunakan untuk uji antibakteri (MHA), peralatan yang digunakan dalam penelitian, kondisi laboratorium saat penelitian.

3.7 Peubah yang diamati

Pada penelitian ini peubah yang diamati adalah *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) untuk mengetahui daya antibakteri dari supernatan isolat *B. subtilis* dari tanah terhadap *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*.

3.8 Analisis Data

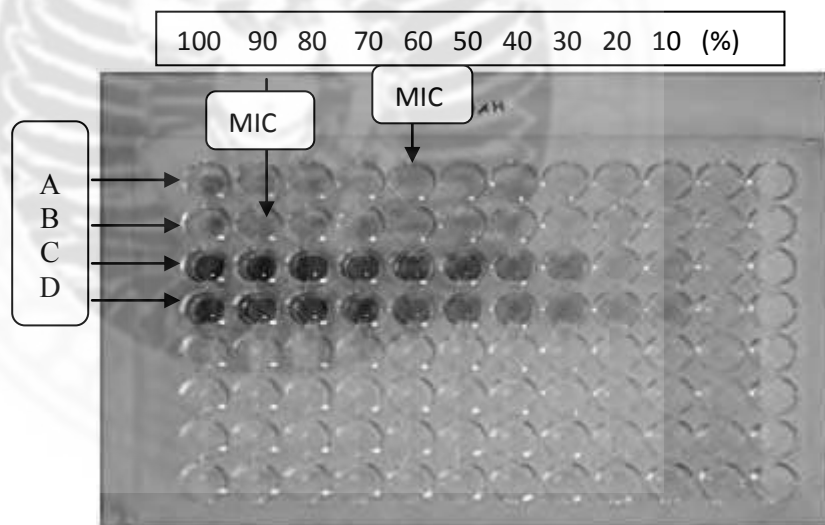
Analisis data pada penelitian ini menggunakan *t Test* untuk mengetahui adanya beda nyata atau tidak nyata dari hasil MIC dan MBC supernatan isolat *B. subtilis* dari tanah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* yang bersifat Gram negatif dan *Staphylococcus aureus* yang bersifat Gram positif.

KERANGKA PENELITIAN

BAB 4 HASIL PENELITIAN

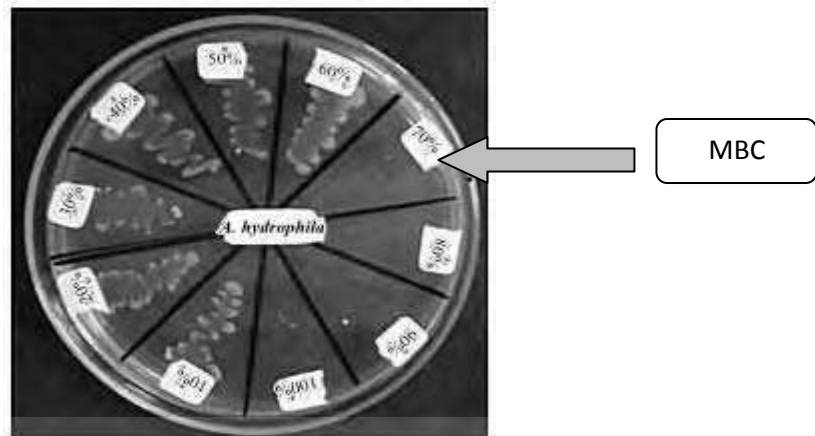
4.1 Daya Antibakteri Supernatan *Bacillus subtilis* (MIC dan MBC)

Setelah *Bacillus subtilis* di re-identifikasi, selanjutnya dilakukan uji daya antibakteri supernatan isolat *B. subtilis* dari tanah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* dilakukan dengan metode mikrodilusi (Bailey dan Scott, 1986; Holowachuk *et al*, 2003). Bakteri indikator yang digunakan adalah *Aeromonas hydrophila* yang bersifat Gram negatif dan *Staphylococcus aureus* yang bersifat Gram positif. Hasil MIC dapat dilihat pada gambar 4.1 dan hasil MBC pada gambar 4.2, 4.3, Lampiran 14 dan tabel 4.1.

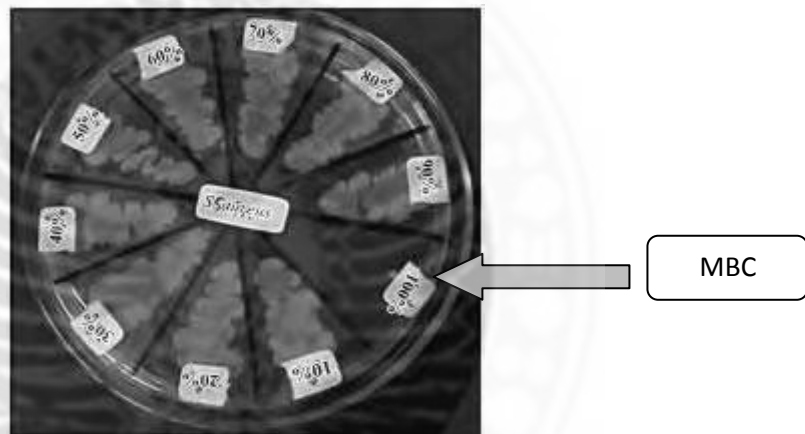


Gambar 4.1 Hasil MIC supernatan *Bacillus subtilis*.

Keterangan : A : supernatan *Bacillus subtilis* + *Aeromonas hydrophila*
 B : supernatan *Bacillus subtilis* + *Staphylococcus aureus*
 C : Kontrol positif + *Aeromonas hydrophila*
 D : Kontrol positif + *Staphylococcus aureus*



Gambar 4.2 Hasil MBC terhadap *Aeromonas hydrophila*



Gambar 4.3 Hasil MBC terhadap *Staphylococcus aureus*

Tabel 4.1 Hasil MIC dan MBC supernatan *Bacillus subtilis* terhadap bakteri indikator dalam konsentrasi (%).

Supernatan <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC
T2	60	70	80	90
T3	60	70	80	90
T4	70	80	90	100
T5	60	70	90	100
T6	70	80	80	90
T7	60	70	80	90
T8	60	70	80	90
T9	60	70	90	100
Σ	500	580	670	750
χ	62,5	72,5	83,75	93,75

Berdasarkan tabel 4.1 dapat diketahui bahwa terdapat daya antibakteri dari supernatan isolat *Bacillus subtilis* dari tanah terhadap *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil MIC supernatan *B. subtilis* terhadap *Aeromonas hydrophila* memiliki kisaran 60%-70%, sedangkan terhadap *Staphylococcus aureus* memiliki kisaran 80%-90%. Hasil MBC supernatan *Bacillus subtilis* terhadap *Aeromonas hydrophila* memiliki kisaran 70%-80%, sedangkan terhadap *Staphylococcus aureus* memiliki kisaran 90%-100%.

Analisis data pada penelitian ini menggunakan *t Test* dengan selang kepercayaan 99% untuk mengetahui perbedaan daya antibakteri supernatan *Bacillus subtilis* terhadap *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil pengamatan MIC dan MBC daya antibakteri supernatan *Bacillus subtilis* terhadap *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*.

Pengamatan	Standard Error	T hitung	T tabel $\alpha=0,01$	Analisis
MIC	2,4549	8,6562	3,449	Berbeda sangat nyata
MBC	2,4549	8,6562	3,449	Berbeda sangat nyata

Analisis statistik menggunakan uji t dengan tingkat kepercayaan 99% yang ditunjukkan pada tabel 4.2 dapat diketahui adanya perbedaan sangat nyata pada MIC dan MBC supernatan isolat *B. subtilis* dari tanah terhadap *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*.

BAB 5 PEMBAHASAN

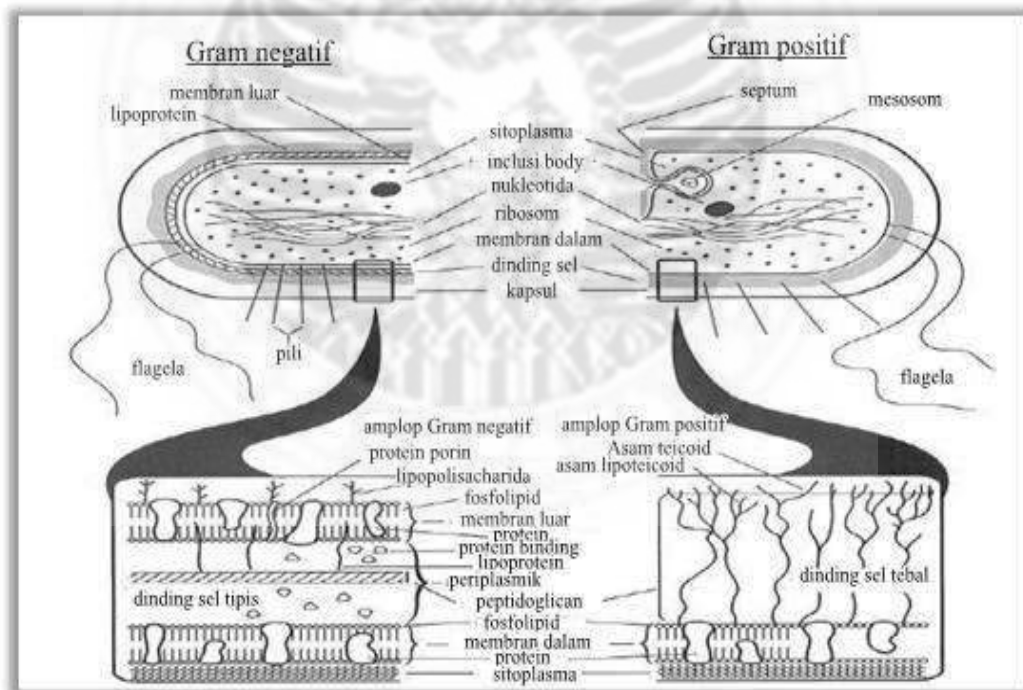
5.1 Daya Antibakteri Supernatan *Bacillus subtilis* (MIC dan MBC)

Penelitian yang dilakukan untuk mengetahui daya antibakteri supernatan isolat *Bacillus subtilis* dari tanah terhadap *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*, dilakukan dengan menentukan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC). Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa terdapat MIC dan MBC dari supernatan isolat *B. subtilis* dari tanah terhadap *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil MIC supernatan isolat *B. subtilis* dari tanah terhadap *Aeromonas hydrophila* memiliki kisaran 60%-70% dan rata-rata 62,5% sedangkan terhadap *Staphylococcus aureus* memiliki kisaran 80%-90% dan rata-rata 83,75%. Hasil MBC supernatan isolat *B. subtilis* dari tanah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* pada kisaran 70%-80% dan rata-rata 72,5% sedangkan terhadap *Staphylococcus aureus* pada kisaran 90%-100% dan rata-rata 93,75%.

Adanya MIC dan MBC menunjukkan bahwa supernatan *B. subtilis* memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*. Supernatan isolat *B. subtilis* dari tanah memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* karena *Bacillus subtilis* mempunyai beberapa bahan antibakteri dalam supernatan seperti polymixin, colistin, circulin dan antibiotik peptid seperti subtilin, subtilisin A, TasA dan sublancin (Leclercq *et al.*, 2006; Awais *et al.*, 2010).

5.2 Perbedaan Daya Antibakteri Supernatan *Bacillus subtilis* terhadap *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*

Hasil uji daya antibakteri supernatan isolat *Bacillus subtilis* dari tanah terhadap *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* pada analisis statistik *t Test* didapatkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan daya antibakteri supernatan *B. subtilis* dari tanah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* yang bersifat Gram negatif dan *Staphylococcus aureus* yang bersifat Gram positif. Klerebezem *et al*, (2004) menyatakan bahwa adanya perbedaan daya antibakteri pada bakteri indikator karena terdapat perbedaan struktur dinding sel pada kedua bakteri indikator.



Gambar 5.1 Struktur dinding sel bakteri Gram negatif dan Gram positif. (Sumber: Boa, 2009)

Berdasarkan gambar 5.1 bakteri Gram positif mempunyai struktur dinding sel yang terdiri dari lapisan peptidoglican tebal dan tidak mempunyai protein atau lipid sedangkan Gram negatif mempunyai struktur dinding sel yang terdiri dari sepasang membran (membran dalam dan membran luar) yang terletak diantara lapisan tipis peptidoglican, membran sel mengandung lipopolisakarida, lemak dan protein (Boa, 2009).

Bahan antibakteri dapat diperoleh dari hampir semua bakteri dan merupakan antibiotik spektrum luas, produksi metabolit seperti organisme asam dan agen litik seperti lisozim. Antibakteri digunakan sebagai pengendalian penyakit infeksi bakteri pada dunia kedokteran hewan (Motta *et al.*, 2004). Mekanisme kerja antibakteri yaitu mengganggu metabolisme sel mikroba, menghambat sintesis dinding sel bakteri, mengganggu permeabilitas membran sel bakteri dan menghambat sintesis atau merusak asam nukleat bakteri (Setiabudy, 1972).

Bacillus subtilis sebagai salah satu bakteri non patogen mempunyai beberapa bahan antibakteri dalam supernatan seperti polimyxin, colistin dan circulin yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif maupun Gram negatif (Leclere *et al.*, 2006). Polymixin dapat meningkatkan permeabilitas zat-zat yang masuk ke dalam sel bakteri seperti ion natrium, klor, kalium, magnesium, kalsium dan lainnya (Awais *et al.*, 2010). Peningkatan pemasukan ion tersebut tanpa diikuti pengeluaran yang seimbang. Hal ini akan menyebabkan kebengkakan (*swelling*). Apabila keadaan ini berlanjut terus maka akan

menyebabkan sel mikroorganisme akan pecah sehingga akan menimbulkan kematian pada mikroorganisme tersebut (Meles dkk., 2011).

Colistin dapat menghambat permeabilitas dinding sel bakteri Gram negatif. Sitoplasma semua sel hidup dibatasi oleh selaput sitoplasma yang bekerja sebagai penghalang dengan permeabilitas selektif, melakukan fungsi pengangkutan aktif sehingga dapat mengendalikan susunan sel. Bila integritas fungsi selaput sitoplasma terganggu sehingga permeabilitas dinding sel berubah atau bahkan menjadi rusak, maka komponen penting, seperti protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain keluar dari sel dan sel berangsur-angsur mati. Amfoterisin B, imidazol, dan polien menunjukkan mekanisme kerja seperti colistin (Leclercq *et al.*, 2006).

Circulin salah satu bahan antibakteri dari *B. subtilis* dapat merusak lapisan peptidoglikan pada dinding sel bakteri (Greenwood dan Whitley, 2002). Circulin yang dihasilkan *B. subtilis* efektif terhadap pertumbuhan bakteri Gram negatif dengan cara merusak lapisan dinding sel bakteri. Ketika pertumbuhan bakteri dihambat, terjadi kerusakan pada vakuola dinding sel bakteri dan membran sitoplasmik akan mengalami kerusakan. Hal ini menyebabkan pertumbuhan bakteri dihambat dan akan menyebabkan kematian pada bakteri (Hwan *et al.*, 2011).

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang daya antibakteri supernatan isolat *Bacillus subtilis* dari tanah terhadap *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Supernatan isolat *Bacillus subtilis* dari tanah memiliki daya antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*.
2. Terdapat perbedaan daya antibakteri supernatan isolat *Bacillus subtilis* dari tanah terhadap *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat disarankan sebagai berikut:

1. Melakukan penelitian lebih lanjut mengenai daya antibakteri supernatan isolat *Bacillus subtilis* dari tanah terhadap bakteri patogen yang lain,
2. Melakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui daya antibakteri supernatan isolat *Bacillus subtilis* dari tanah terhadap *Aeromonas hydrophila* yang bersifat Gram negatif dan *Staphylococcus aureus* yang bersifat Gram positif secara *in vivo*.

RINGKASAN

MADYA ADI WASKITA. “Daya Antibakteri Supernatan Isolat *Bacillus subtilis* dari Tanah terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* Secara *in vitro*”. Penelitian ini dilaksanakan di bawah bimbingan Erni Rosilawati Sabar Iman, M.S., drh sebagai Pembimbing Utama sekaligus ketua penelitian dan Dr. Mirni Lamid, MP., drh sebagai Pembimbing Serta.

Penyakit infeksi yang disebabkan bakteri merupakan penyebab kematian yang paling besar pada hewan. Salah satu bakteri Gram negatif seperti *Aeromonas hydrophila* sangat penting dalam dunia perikanan karena merupakan bakteri patogen yang sering menimbulkan kematian pada ikan. Bakteri Gram positif seperti *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri patogen yang mengindikasikan adanya kontaminasi kebersihan air dan menyebabkan infeksi sekunder pada ikan. Berbagai usaha penanggulangan penyakit infeksi oleh bakteri telah banyak dilakukan diantaranya penggunaan antibiotik spektrum luas dan sempit, akan tetapi pemberian antibiotik dapat menimbulkan resistensi. Perlu adanya alternatif pengobatan dalam penanggulangan penyakit sehingga didapat produk yang bebas bakteri patogen dan residu antibiotik. *Bacillus subtilis* merupakan salah satu bakteri dari genus *Bacillus* yang dapat digunakan sebagai probiotik karena merupakan bakteri yang tidak patogen.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui daya antibakteri supernatan (MIC dan MBC) isolat *B. subtilis* dari tanah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* dan membandingkan daya antibakteri supernatan isolat *B. subtilis* dari tanah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* yang bersifat Gram negatif dan *Staphylococcus aureus* yang bersifat Gram positif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat daya antibakteri supernatan (MIC dan MBC) isolat *Bacillus subtilis* dari tanah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus*. Hal ini menunjukkan bahwa dalam supernatan *B. subtilis* terkandung beberapa bahan antibakteri seperti polymixin, colistin, circulin dan antibiotik peptid seperti subtilin, subtilosin A, TasA dan sublancin. Terdapat perbedaan daya antibakteri supernatan isolat *Bacillus subtilis* dari tanah terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* dikarenakan terdapat perbedaan struktur dinding sel pada kedua bakteri.

Berdasarkan hasil penelitian disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai daya antibakteri supernatan isolat *Bacillus subtilis* dari tanah terhadap bakteri patogen yang lain dan melakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui bahan antibakteri yang dapat membunuh bakteri Gram negatif dan Gram positif.

DAFTAR PUSTAKA

- Aslim, B., S. Neode and B. Yavuz. 2002. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. *Turkish Journal of Biology*.41-48.
- Atyah, M.A.S., M.Z. Saad and A.S. Zahrah. 2010. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from cage-cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Microbiology* 144 (2010) 502–504
- Austin, B. and D.A. Austin. 2007. *Bacterial fish pathogens Disease of Farmed and Wild Fish*, 4th Edition. Springer Praxis. Godalming. UK
- Awais, M., A.A. Shah, A. Hammed and F. Hasan. 2007. Isolation, identification and optimization of Bacitracin produced *Bacillus* sp. *Pak. J. Bot.*, 39(4): 1303-1312
- Awais, M., A. Pervez, A. Yaqub and M.M. Shah. 2010. Production of antimicrobial metabolites by *Bacillus subtilis* immobilized in Polyacrylamide Gel. *Pakistan J. Zool.*, vol. 42(3):267-275
- Banu, Y. and A. Yilmaz. 2009. Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Probiotics: Production, Evaluation and Uses in Animal Feed*. 1-15
- Bailey and Scott. 1986. *Diagnostic Microbiology*. 7th edition. The C. V. Mosby Company. St. Louis. United States of America.
- Bailey and Scott. 2002. *Diagnostic Microbiology*. 11th edition. The C. V. Mosby Company. St. Louis. United States of America. 232.240
- Balcazar, J.L., I. de Blas, I.R. Zrzuela, D. Cunningham, D. Vendrell and J.L. Muzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114:173-186
- Beleneva, I. A. 2011. Incidence and characteristics of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* from the Japan and South China seas. *Marine Pollution Bulletin* 62.382–387
- Boa, A.N. 2009. *The Bacterial Cell Wall*. Department of Chemistry University of Hull.
- Cartwright, P. 2009. *Bacillus subtilis-Identification and Safety*. Human Microbiota Specialist Probiotics International Utd. Somerset. UK

- Cipriano, R.C. 2001. *Aeromonas hydrophyla* and Motile Aeromonad Septicemias of Fish. U.S. Geological Survey, Leetown Science Center, National Fish Health Research Laboratory
- Dhanapathi, T.G. Prabhakar and P. Prabhakar. 2008. Antibacterial activity of *Bacillus subtilis* extract on pathogenic organisms. *J. Veterinary & Animal Sciences* 4 (4) 150-153
- Difco™ & BBL™ Manual. 2009.
- Dwijoseputro, D. 1994, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Jakarta; Djambatan.
- Earl, A.M., R. Losick and R. Kolter. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* Vol.16 No.6.269-275
- Feliatra, I.E. dan E. Suryani. 2004. Isolasi dan identifikasi bakteri probiotik dari ikan kerapu macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam upaya efisiensi pakan ikan. *Jurnal Natur Indonesia*. Pekanbaru
- Fritze, D. 2004. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. *The American Phytopathological Society* Vol. 94, No. 11, 2004 1245-1248
- Flores, M.L. and G.A. Guzman. 2009. The use of probiotic in fish and shrimp aquaculture. *Probiotics: Production, Evaluation and Uses in Animal Feed*, 2009: ISBN: 978-81-308-0323-4
- Gaynor, M and A.S. Mankin. 2005. Macrolide Antibiotics: Binding site, mechanism of action, resistance. *Frontiers in Medicinal Chemistry*, 2005, 2, 21-35 21
- Gill, B.G., A. Roque and F.J. Turnbull. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Journal of aquaculture*. 259-270
- Greenwood, D and R. Whitley. 2002. Antibacterial agents: Modes of action. pp12-24
- Hanina, M. N., H.M. Shahril, M.F Innsan, I.N. Asyikin, A.K. Jalil, M.R. Salina and I.B. Ahmad. 2011. Protein production by *Bacillus subtilis* ATCC 2132 in the presence of *Cymbopogon* Essential oils. *World Academy of Science, Engineering and Technology* (59):272-277.

- Hammad, A.M., W. Watanabe, T. Fujii and T. Shimamoto. 2012. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and – susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *International Journal of Food Microbiology* 156: 286–289
- Hendrawan, D. 2013. Isolation and Identification of *Aeromonas hydrophila* as the Cause of Motile *Aeromonas* Septicaemia Disease on Gourami (*Osporonemus gouramy*) in Jatitengan Village, Selopuro District, Blitar, East Java. Thesis. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Holowachuk, S.A., M.F. Bal'a, K. Randal and Buddington. 2003. A kinetic microplate method for quantifying the antibacterial properties of biological fluids. *Journal of Microbiological Methods* 55: pp 441– 446
- Holt, J. G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore. U.S.A. 190-191. ISBN 978-0-683-00603-2.
- Hwan, K. S., H.S. Lee, D.S. Ryu, S.J. Choi and D.S. Lee. 2011. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol* 39(1):77–85
- Islam, M. A., M.M. Alam, M.E. Choudhury, N. Kobayashi and U. Ahmed. 2008. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of Cloxacillin for selected isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with antibiogram. *Bangl. J. Vet. Med.* (2008). 6 (1): 121–126
- Jian Li, R.L. Nation, J.D. Turnidge, R.W. Milne, K. Coulthard, C.R. Rayner and L.D. Peterson. 2002. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *University of South Australia, Adelaide, South Australia*
- Kaiser, G.E. 2011. *Lab8: Identification of Bacteria Through Biochemical Testing*.
- Kleerebezem, M., R. Bongers, G. Rutten, M. Willem and O.P. Kuipers. 2004. Autoregulation of subtilin biosynthesis in *Bacillus subtilis*: the role of the *spa*-box in subtilin-responsive promoters. *Peptides* 25 (2004) 1415–1424
- Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Scjreckenbereger, W.C. Winn Jr. 1992. *Diagnostic Microbiology*. J.B Lippincott Company. Philadelphia

- Leclercq, V., R. Marti, M. Bechet, P. Fickers and P. Jacques. 2006. The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Arch Microbiol* (2006) 186:475–483
- Li, Y.J. and B. Hu. 2012. Establishment of Multi-Site Infection Model in Zebrafish Larvae for Studying *Staphylococcus aureus* Infectious Disease. *Journal of Genetics and Genomics* 39: 521-534
- Logan, N. A. and R.C.W. Berkeley. 1984. Identification of *Bacillus* strains using API system. Department of Microbiology. The Medical School. University of Bristol. *Journal of General Microbiology*. 130:1871-1882.
- Meles, D.K., S.A. Sudjarwo, T. Juniastuti, I.S. Hamid dan R. Kurnijasanti. 2011. *Buku Ajar Farmakoterapi dan Toksikologi*. Global Persada Pers Surabaya
- Motta, A.S., F.C. Olivera and A. Brandelli. 2004. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon Basin. *Brazilian Journal of Microbiology* 35:307-310
- Nicholson, W.L. 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell. Mol. Life. Sci.* 59. 410-416
- Oxoid Manual. 1982
- Pachanawan, A. 2008. Potential of *Psidium guajava* Supplemented Fish Diets in Controlling *Aeromonas hydrophila* Infection in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106(5). 419–424.
- Peter, L. G. and M.A. Marahiel. 1999. Cold Shock Response in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*1(2): 203-209.
- Poobalene, S. 2008. Protein expression by *Aeromonas hydrophila* during growth in vitro and in vivo. *Microbial Pathogenesis* (45).60–69
- Ray, R.C. 2009. *Aquaculture Microbiology and Biotechnology*. Volume 1. Science Publishers. USA. 186-196
- Riesenman, P.J. And Nicholson, W. L. 2000. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, Artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 66(2):620–626
- Rosilawati, E,S,I, R. Ratnasari, H.E. Narumi, S. Sarudji, W. Tyaningsih dan S. Chusniati, S. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Veteriner I*. Airlangga University

- Setiabudy, R. 1972. Sulfonamid, Kortikosteroid dan Antiseptik. Farmakologi dan Terapi Edisi 5. Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Susanti, L. 2011. Antibacterial Susceptibility of *Bacillus subtilis* Isolated from Soil and Fishpond Sedimen. Thesis. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Wakita, H., H. Shimada, H. Itoh, T. Matsuyama and M. Masushita. 2010. Periodic colony formation by bacterial Species *Bacillus subtilis*. Journal of the physical society of Japan Vol.70.No. 3. March. 2001.pp.911-919. Japan
- WHO. 2008. Traditional Medicine. London Ontario Canada
- Zaenab, H.W. Mardiasuti, V.P Anny dan B. Logawa. 2004. Uji antibakteri siwak (*Salvadora persica* Linn.) terhadap *Streptococcus mutans* (ATCC31987) dan *Bacteroides melaninogenicus*. Makara, Kesehatan. Vol.8(2),pp.37-40
- Zakaria, Z.A., A.S. Sufian, K. Ramasamy, N. Ahmat, M.R. Sulaiman, A.K. Arifah, A. Zuraini and M.N. Somchit. 2010. In vitro antimicrobial activity of *Muntinga calabura* extracts and fractions. African Journal of Microbiology. Vol.4(4),pp. 304-308

Lampiran 1. Tabel hasil MIC dan MBC

Bakteri indikator	Konsentrasi (%)	Supernatan isolat <i>Bacillus subtilis</i> dari tanah								Kontrol Positif
		T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	90	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	70	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	60	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	50	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	40	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	30	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	90	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	80	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	70	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	60	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	50	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	40	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	30	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Keterangan : (+) Terjadi pertumbuhan bakteri pada media MHA

(-) Tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada media MHA

Lampiran 2. Analisis statistik *Minimum Inhibitory Concentration* dengan *t Test*

$$\begin{aligned}
 t \text{ hitung} &= \frac{\text{Rerata A} - \text{Rerata B}}{\frac{\sqrt{\text{Std } A^2 + \text{Std } B^2}}{8}} \\
 &= \frac{83,75 - 62,5}{\frac{\sqrt{187,5/7 + 150/7}}{8}} \\
 &= \frac{21,25}{\frac{\sqrt{187,5 + 150}}{56}} \\
 &= \frac{21,25}{\sqrt{337,7/56}} \\
 &= \frac{21,25}{\sqrt{6,0267}} \\
 &= \frac{21,25}{2,4549} \\
 &= 8,6562
 \end{aligned}$$

Lampiran 3. Analisis statistik *Minimum Bactericidal Concentration* dengan *t Test*

$$\begin{aligned}
 t \text{ hitung} &= \frac{\text{Rerata A} - \text{Rerata B}}{\frac{\sqrt{\text{Std A}^2 + \text{Std B}^2}}{8}} \\
 &= \frac{93,75 - 72,5}{\frac{\sqrt{187,5/7 + 150/7}}{8}} \\
 &= \frac{21,25}{\frac{\sqrt{187,5 + 150}}{56}} \\
 &= \frac{21,25}{\sqrt{337,7/56}} \\
 &= \frac{21,25}{\sqrt{6,0267}} \\
 &= \frac{21,25}{2,4549} \\
 &= 8,6562
 \end{aligned}$$

Lampiran 4. Pembuatan *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Oxoid., 1982).

Komposisi MHA (*Oxoid*) per liter :

Meat infusion	6,0 g
Casein Hydrolysate	17,5 g
Starch	1,5 g
Agar	10,0 g

pH 7.3 ± 0.1 pada 25 °C

Cara Kerja :

1. Buat suspensi 35 g MHA dalam 1 liter aquades steril dan aduk rata.
2. Panaskan hingga mendidih selama 1 menit hingga MHA terlarut
3. Lakukan sterilisasi dengan autoclave pada 121 °C selama 15 menit.
4. Setelah sterilisasi kemudian tuang agar kedalam cawan petri steril yang tersedia
5. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 37 °C.

Lampiran 5. Pembuatan Media *Manitol Salt Agar* (MSA) (Oxoid., 1982).

Komposisi *Manitol Salt Agar* Medium per liter :

' Lab-Lemco' Powder	1,0 g
Peptone	10,0 g
Mannitol	10,0 g
Sodium chloride	75,0 g
Phenol red	0,025 g
Agar	15,0 g

pH 7.4 ± 0.2 pada 25 °C

Cara kerja :

1. Buat suspensi 111 g media dalam 1 liter aquades steril kemudian aduk rata,
2. Panaskan hingga mendidih selama 1 menit sampai agar terlarut.
3. Lakukan sterilisasi dengan autoclave selama 15 menit pada suhu 121 °C.
4. Setelah sterilisasi kemudian tuang agar kedalam cawan petri steril dan dinginkan.
5. Lakukan uji sterilitas dengan menginkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.

Lampiran 6. Pemeriksaan Mikroskopis dengan Pewarnaan Gram (Departemen Pertanian Balai Karantina Pertanian., 2008)

Alat dan Bahan :

- Gelas Obyek
- Ose bulat
- Pembakar bunsen
- Isolat bakteri
- Kristal violet
- Lugol
- Alkohol aceton
- Safranin

Cara Kerja :

1. Buat sediaan oles dan fiksasi diatas api sampai kering.
2. Genangi olesan bakteri dengan larutan Kristal violet selama 1 menit.
3. Dibilas dengan air kran selama beberapa detik, lalu kering anginkan.
4. Digenangi dengan larutan lugol dan biarkan selama 1 menit.
5. Dibilas dengan air kran selama beberapa detik, lalu kering anginkan.
6. Dibilas dengan *alcohol aceton* selama 30 detik, lalu kering anginkan.
7. Dibilas dengan air kran selama 2 detik.
8. Digenangi dengan larutan safranin selama 10 detik.
9. Buang sisa safranin dan bilas dengan air kran
10. Keringkan dengan cara di angin-anginkan atau menggunakan kertas saring.
11. Amati hasil pewarnaan dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 x dengan minyak emersi.

Lampiran 7. Pemeriksaan Produksi Katalase (Koneman *et al*, 1992).

Alat dan Bahan :

- Isolat bakteri
- H₂O₂ 3%
- Gelas Obyek

Cara Kerja :

1. Ambil isolat bakteri dengan ose kemudian letakkan pada gelas obyek.
2. Teteskan H₂O₂ 3% diatas isolat bakteri yang ada di gelas obyek.
3. Amati adanya gelembung gas yang timbul.

Lampiran 8. Pemeriksaan VP (*Voges-Proskauer*) (Oxoid, 1982).

Komposisi MR-VP medium per liter :

Peptone	5.0 gr
Glucose	5.0 gr
Phosphate Buffer	5.0 gr

pH 7.5 ± 0.2 pada $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Prosedur Pembuatan Media VP :

1. Larutkan 15 gram media kedalam 1 liter aquades steril.
2. Panaskan sambil diaduk hingga larut sempurna.
3. Larutan disterilkan dengan autoclave pada suhu $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit.
4. Dinginkan lalu tuang larutan dalam tabung reaksi dengan volume 1-2 ml.
5. Biarkan media hingga dingin
6. Inkubasi media pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.

Prosedur uji VP :

1. Inokulasi bakteri pada media kemudian diinkubasi pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam.
2. Teteskan reagen a-naphtol dan KOH pada dinding dalam dari tabung.
3. Hasil positif maka akan terjadi perubahan warna menjadi merah tua.

Lampiran 9. Pemeriksaan produksi enzim urease (Oxoid., 1982).

Komposisi *Urea Agar Medium* per liter:

Peptone	1,0 gram
Dextrose	1,0 gram
Disodium Phosphate	1,2 gram
Potassium dihydrogen phosphate	0,8 gram
Sodium chloride	5,0 gram
Phenol red	0,012 gram
Agar	15,0 gram

pH 6,8 ±0,2 pada 25 °C

Cara kerja pembuatan media urea agar:

1. Larutkan 2,4 gram media ke dalam 95 ml aquades steril,
2. Panaskan sambil diaduk hingga larut sempurna,
3. Larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit,
4. Didinginkan sampai 50 °C dan secara aseptik masukkan 5 ml larutan urea steril kemudian aduk hingga homogen,
5. Tuangkan pada tabung steril dan miringkan,
6. Biarkan media hingga mengeras,
7. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam,
8. Simpan media yang tidak terkontaminasi dalam lemari es sampai diperlukan.

Prosedur uji urease:

1. Tanam bakteri pada permukaan miring agar,
2. Inkubasikan 37 °C selama 24 jam,
3. Hasil positif menunjukkan media berubah menjadi ungu atau pink, bila hasil negatif maka media tidak mengalami perubahan warna.

Lampiran 10. Pemeriksaan SIM (*Sulfide Indol Motility*) (Oxoid., 1982).

Komposisi SIM *medium* per liter:

Tryptone	20,0 gram
Peptone	6,1 gram
Ferrous Amonium Sulfat	0,2 gram
Sodium thiosulfat	0,2 gram
Agar	3,5 gram

pH $7,3 \pm 0,2$ pada $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Prosedur pembuatan media SIM:

1. Larutkan 30 gram media ke dalam 1 liter aquades steril,
2. Panaskan sambil diaduk hingga larut sempurna,
3. Larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit,
4. Tuang larutan ke dalam tabung reaksi dengan volume 1-2 ml,
5. Biarkan hingga media dingin,
6. Inkubasi media pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.

Prosedur pengujian SIM:

1. Inokulasi bakteri pada media SIM kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam,
2. Kemudian teteskan 15 tetes reagen kovach dan kloroform pada dinding dalam dari tabung,
3. Munculnya warna terang merah di permukaan dalam hitungan detik setelah diberi reagen merupakan indikasi adanya indol dan tes positif.

Lampiran 11. Pemeriksaan Sitrat (Oxoid., 1982).

Komposisi media SCA (*Simmons Citrate Agar*) per liter:

Magnesium sulphate	0,2 gram
Amonium dehydrogen phosphate	0,2 gram
Sodium amonium phosphate	0,8 gram
Sodium sitrat tribasic	2,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
Bromthymol blue	0,05 gram
Agar	15,0 gram

pH $7 \pm 0,2$ pada $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Cara kerja pembuatan SCA:

1. Larutkan 23 gram media ke dalam 1 liter aquades steril,
2. Panaskan sambil diaduk hingga larut sempurna,
3. Larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit,
4. Tuang larutan ke dalam tabung reaksi dengan volume $\pm 1\text{-}2$ ml dan miringkan,
5. Biarkan media hingga mengeras,
6. Inkubasi media pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.
7. Simpan media yang tidak terkontaminasi dalam lemari es sampai diperlukan.

Prosedur uji sitrat:

1. Tanam bakteri pada permukaan miring agar,
2. Inkubasikan pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam,
3. Reaksi positif ditandai dengan pertumbuhan dengan warna biru pada agar miring.

Lampiran 12. Pemeriksaan Hidrolisis *Starch* (Difco™ & BBL™ Manual, 2009).

Komposisi *Starch Agar medium (difco)* per liter:

Agar	12,0 gram
Soluble Starch	10,0 gram
Beef Extract	3,0 gram

Prosedur pembuatan media starch agar:

1. Buat suspensi 25 gram media dalam 1 liter aquades steril kemudian aduk rata,
2. Panaskan hingga mendidih selama 1 menit sampai agar terlarut dalam air,
3. Lakukan sterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C,
4. Tuang agar ke dalam cawan petri dan dinginkan,
5. Lakukan uji sterilitas dengan menginkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C,
6. Simpan media yang tidak terkontaminasi dalam lemari es sampai diperlukan.

Prosedur uji Hidrolisis starch:

1. Lakukan isolasi koloni dari spesimen kemudian inkubasi selama 48 jam dengan suhu 37 °C,
2. Setelah 48 jam banjiri media dengan larutan iodine Gram,
3. Pati hidrolisis positif ditunjukkan oleh zona tidak berwarna sekitar koloni. Sebuah zona biru atau ungu menunjukkan yang belum terhidrolisis.

Lampiran 13. Pembuatan standard *McFarland 0,5* (Bailey dan Scott., 2002).

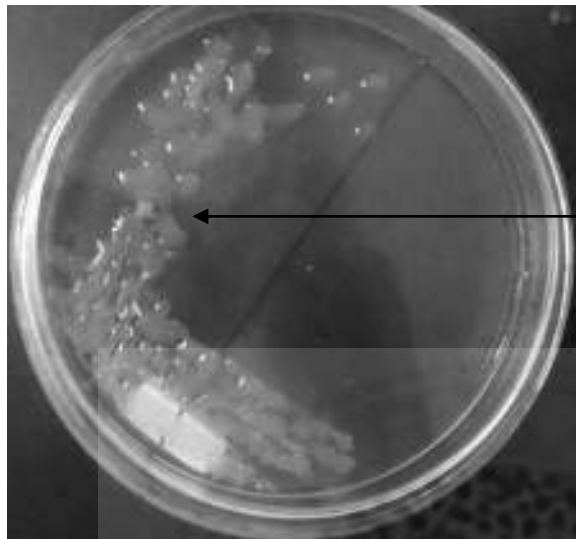
Tabel McFarland Nephelometer Standard:

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
0,1% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
0,1% Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Approx. cell density (1×10^8 CFU/mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Transmittance	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbance	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

Komposisi Standard McFarland 0,5 :

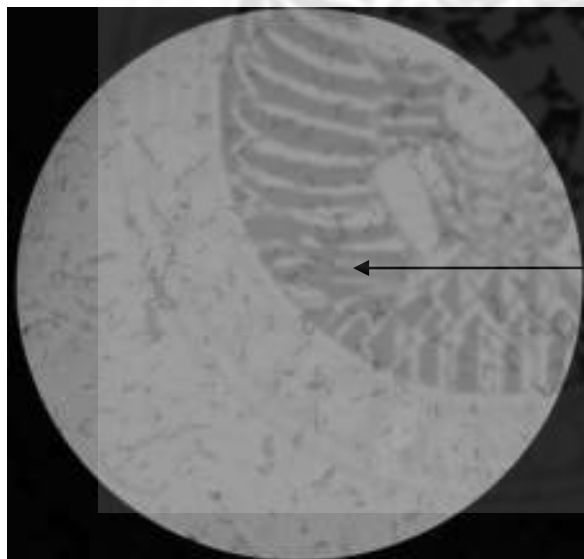
Sulfuric acid 1%	9.95 ml
Barium chloride	0.05 ml

Lampiran 14. Gambar Hasil Penelitian, Alat dan Bahan



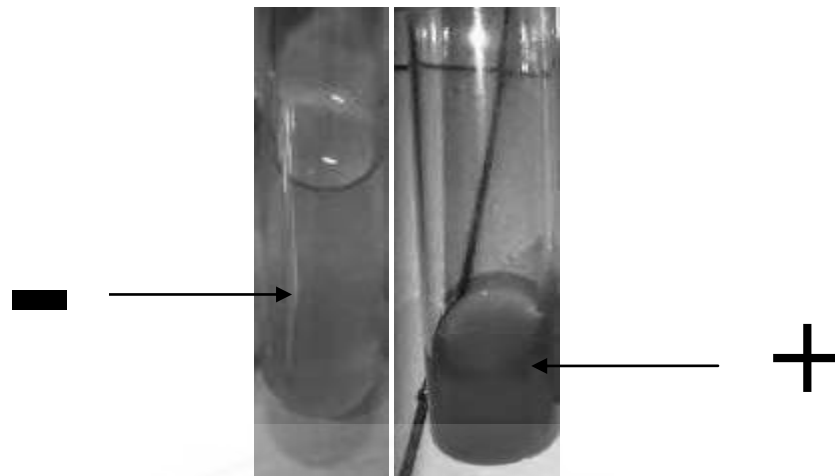
Gambaran makroskopis koloni *Bacillus subtilis*

Gambar 1. *Bacillus subtilis* secara makroskopis (berdasarkan Wakita *et al.*, 2010)

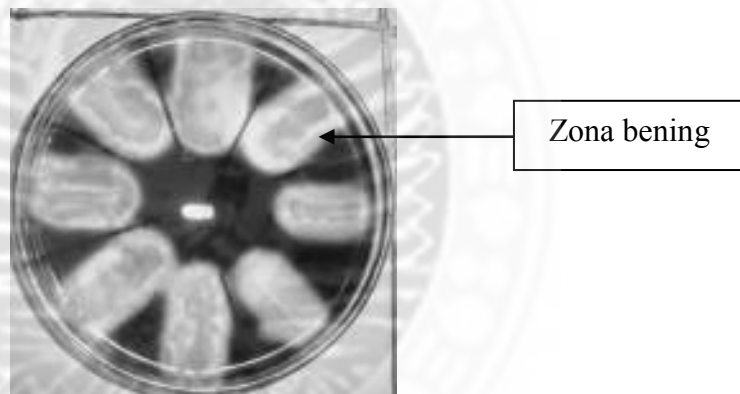


Gambaran mikroskopis *Bacillus subtilis*

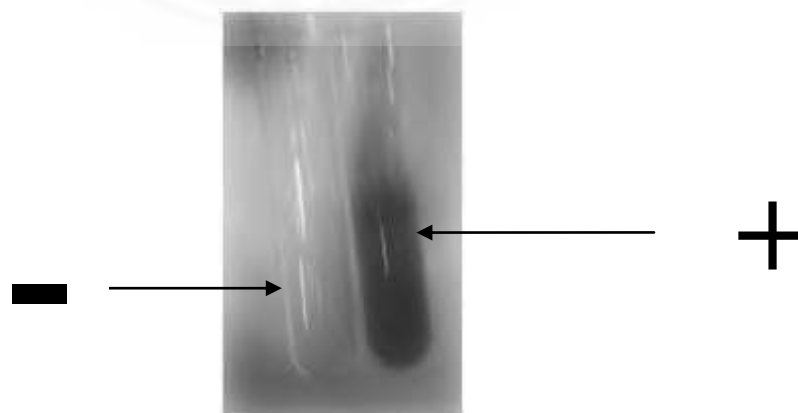
Gambar 2. Gambar mikroskopis *Bacillus subtilis* dengan perbesaran 1000x



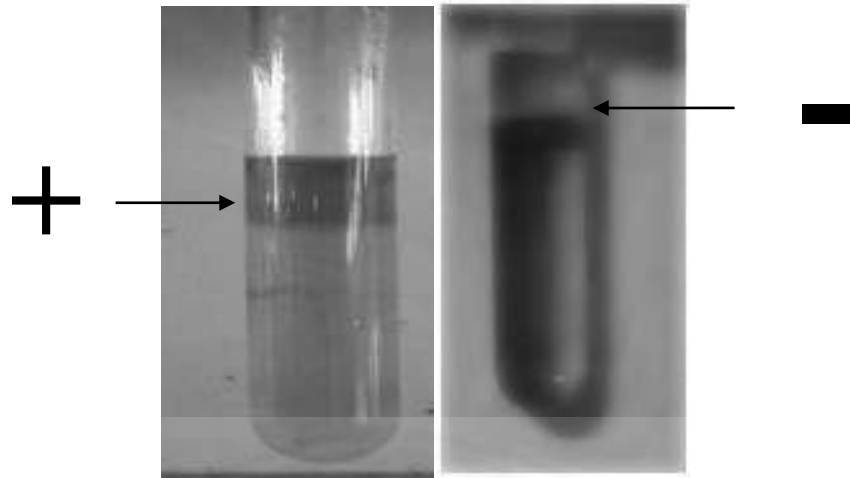
Gambar 3. Hasil uji VP. VP positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi merah



Gambar 4. Hasil uji starch. Starch positif ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar daerah yang ditumbuhi bakteri.



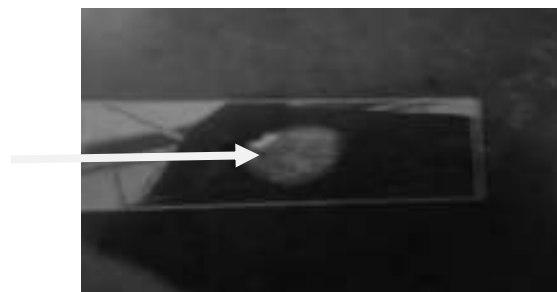
Gambar 5. Hasil uji urea. Urea negatif ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna media.



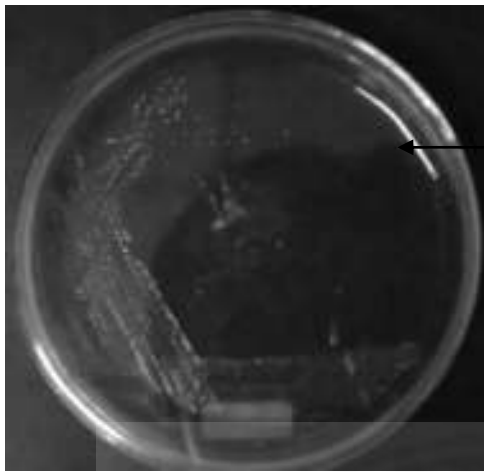
Gambar 6. Hasil uji SIM. Sulfide negatif tidak munculnya endapan hitam, indol negatif tidak terbentuknya cincin warna merah, motilitas positif dengan terdapat bentukan cemara terbalik.



Gambar 7. Hasil uji sitrat. Uji sitrat positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna media menjadi biru

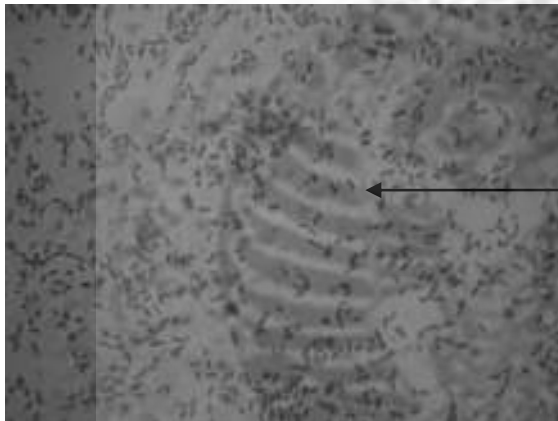


Gambar 8. Hasil uji katalase. Katalase positif ditunjukkan adanya gelembung.



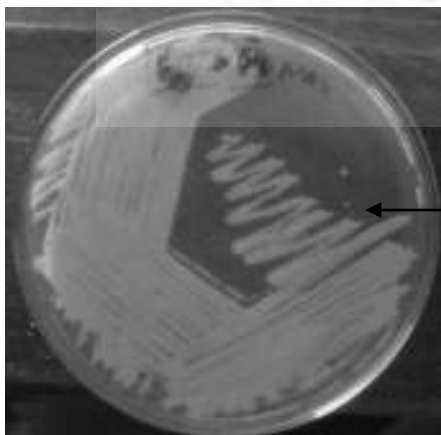
Gambaran makroskopis koloni
Aeromonas hydrophila

Gambar 9. *Aeromonas hydrophila* secara makroskopis



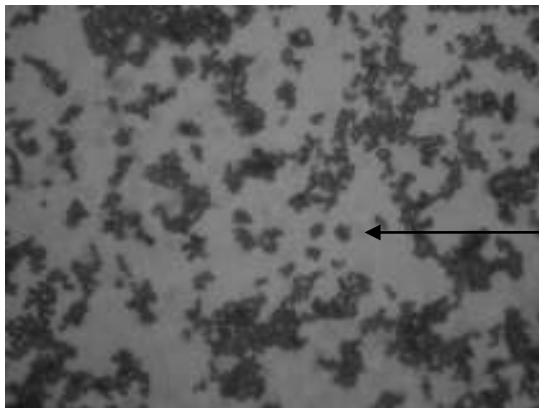
Gambaran mikroskopis *Aeromonas hydrophila*

Gambar 10. *Aeromonas hydrophila* secara mikroskopis dengan perbesaran 1000x



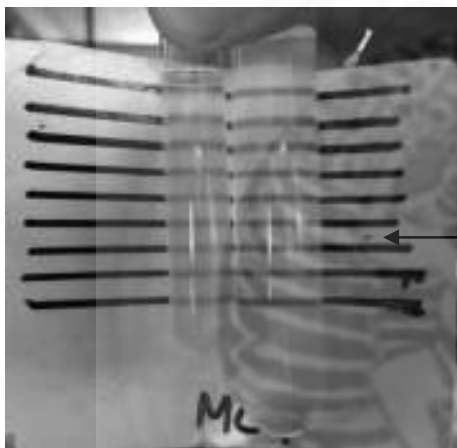
Gambaran makroskopis koloni
Staphylococcus aureus

Gambar 11. *Staphylococcus aureus* secara makroskopis



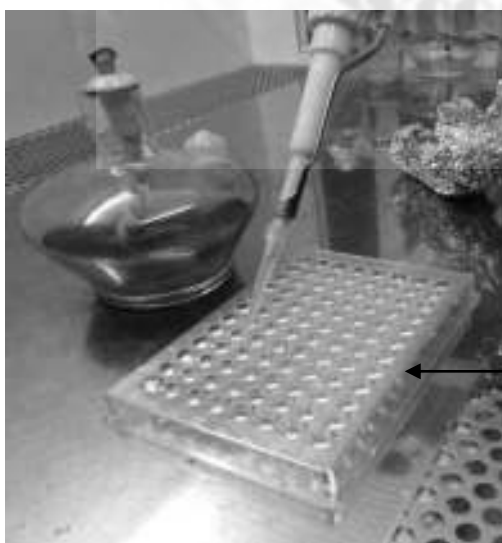
Gambaran mikroskopis
Staphylococcus aureus

Gambar 12. *Staphylococcus aureus* secara mikroskopis dengan perbesaran 1000x



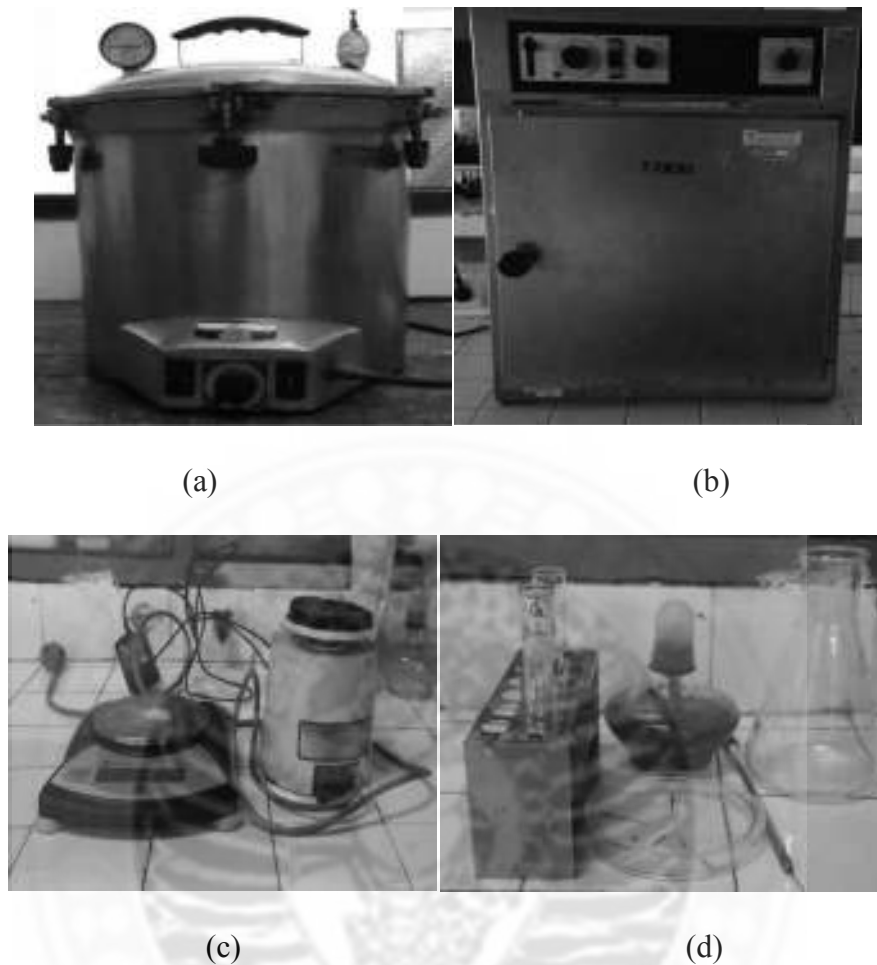
Standard McFarland 0,5

Gambar 13. Penyesuaian suspensi bakteri dengan standard McFarland 0,5

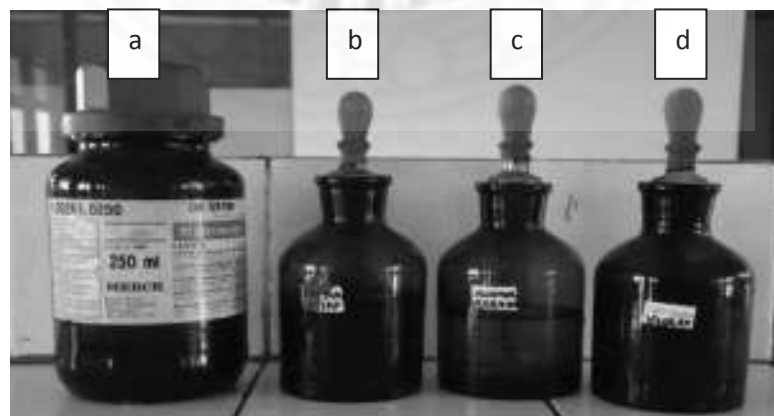


Alat untuk mikrodilusi

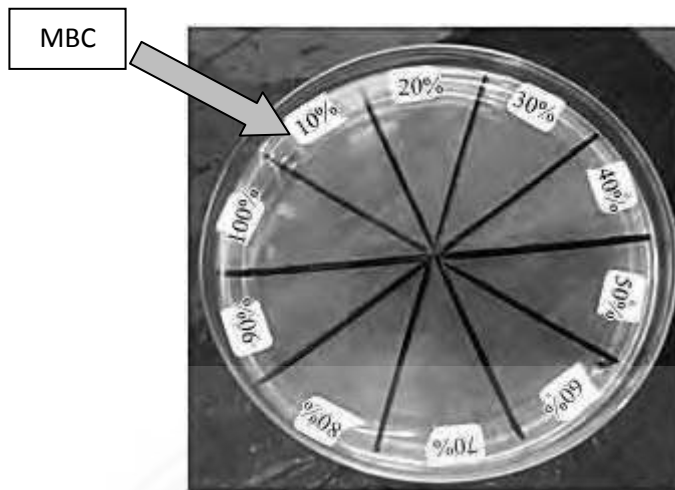
Gambar 14. Alat yang digunakan untuk metode mikrodilusi



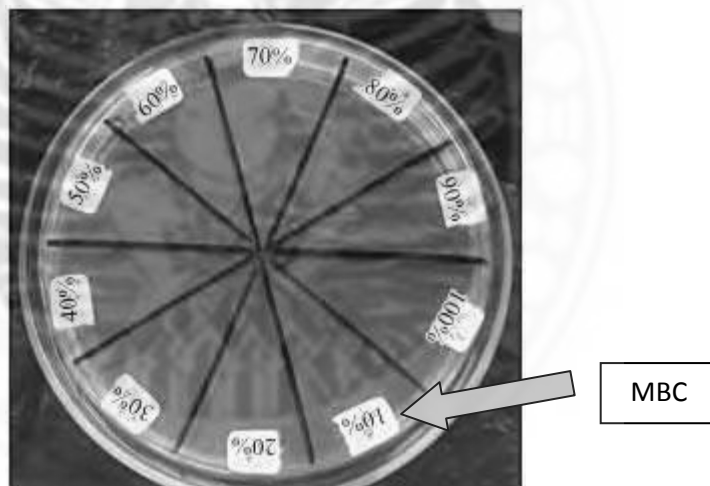
Gambar 15. Alat-alat penelitian. a: autoklaf, b: inkubator, c: timbangan digital dan vortex, d: rak tabung reaksi, tabung reaksi, petridis, bunsen, erlenmeyer, ose.



Gambar 16. Bahan pewarnaan Gram. A: lugol, b: safranin, c: alkohol aceton, d: gentian violet



Gambar 17. Hasil MBC kontrol positif terhadap *Aeromonas hydrophila*



Gambar 18. Hasil MBC kontrol positif terhadap *Staphylococcus aureus*