

BAB IV

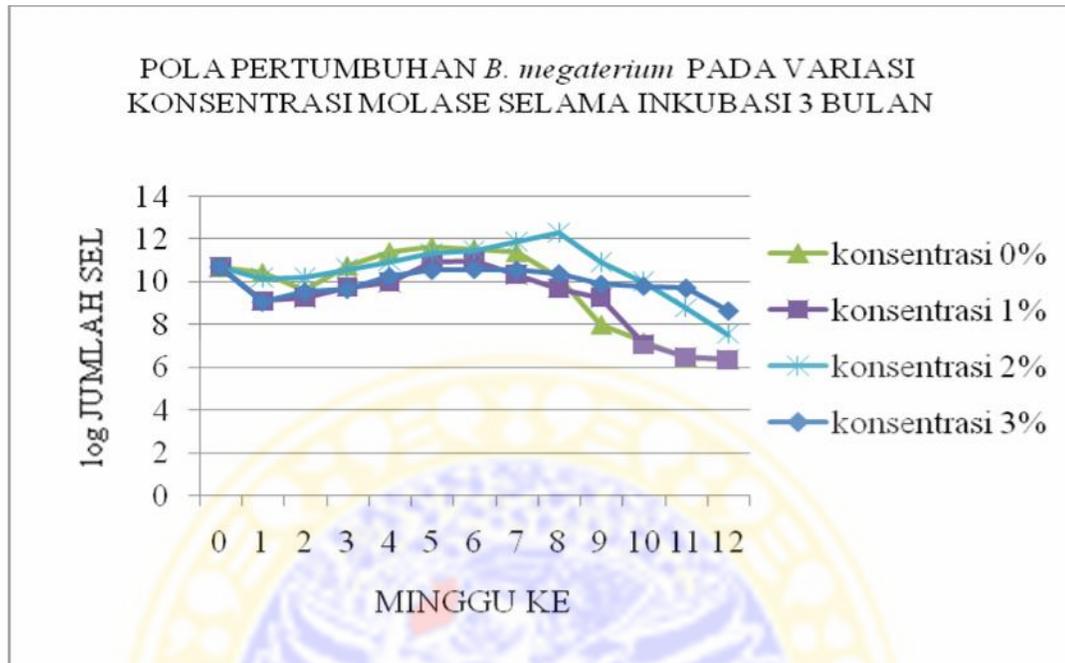
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini berupa jumlah sel (CFU/ml) *Bacillus megaterium* dengan kombinasi variasi molase dan waktu inkubasi. Variasi konsentrasi molase terdiri atas 1%, 2% dan 3% serta kontrol pada setiap inkubasi selama 3 bulan. Jumlah sel dibuat rata-rata sehingga dapat diketahui pola pertumbuhan *Bacillus megaterium*, viabilitas *Bacillus megaterium* di akhir inkubasi.

4.1 Pola Pertumbuhan Bakteri Probiotik *Bacillus megaterium* pada Variasi Konsentrasi Molase

Tabel 4.1 Rerata jumlah sel (log) bakteri *Bacillus megaterium* dengan kombinasi variasi konsentrasi molase dan waktu inkubasi

t (Minggu)	TOTAL BAKTERI (Log)			
	Kontrol (NB)	1%	2%	3%
0	10,68±0,05	10,68±0,16	10,68±0,08	10,68±0,06
1	10,43±0,10	9,11±0,09	10,18±0,08	9,04±0,17
2	9,60±0,08	9,26±0,14	10,20±0,02	9,52±0,38
3	10,75±0,06	9,76±0,16	10,60±0,22	9,64±0,97
4	11,40±0,37	9,98±0,39	10,94±0,22	10,23±0,23
5	11,65±0,24	10,91±0,19	11,32±0,29	10,53±0,08
6	11,54±0,20	11,00±0,79	11,48±0,10	10,57±0,31
7	11,38±0,71	10,34±0,39	11,88±0,34	10,53±0,36
8	10,20±0,53	9,70±0,27	12,30±0,17	10,36±0,19
9	8,00±0,62	9,26±0,30	10,92±0,79	9,87±0,33
10	7,18±0,17	7,08±0,24	10,00±0,26	9,79±0,41
11	6,43±0,57	6,49±0,13	8,79±0,06	9,69±0,48
12	6,36±0,13	6,36±0,23	7,54±0,40	8,63±0,46



Gambar 3. Pola pertumbuhan *Bacillus megaterium* pada variasi konsentrasi molase

Pertumbuhan merupakan puncak aktivitas fisiologi yang saling mempengaruhi secara berurutan. Proses pertumbuhan ini sangat kompleks, mencakup pemasukan nutrisi dasar dari lingkungan ke dalam sel, konversi bahan-bahan nutrisi menjadi energi dan berbagai konstituen vital sel serta perkembangbiakan (Moat, 1979 dalam Judoamidjoyo, 1989). Jumlah sel bakteri dapat diamati dengan pola pertumbuhan sehingga didapatkan fase lag, fase log, fase stasioner dan fase kematian. Pola pertumbuhan bakteri *Bacillus megaterium* pada konsentrasi molase 1%, 2%, 3% serta kontrol berbeda. Hal ini dikarenakan di dalam setiap konsentrasi memiliki kandungan nutrisi yang berbeda-beda. Kandungan nutrisi pada media molase ini menentukan viabilitas (jumlah sel) dari bakteri *Bacillus megaterium*.

Pertumbuhan bakteri yang paling baik terdapat pada fase log akhir. Pada fase ini, sel mulai aktif membelah serta perkembangbiakan meningkat sehingga didapatkan jumlah sel terbanyak. Perkembangbiakan berhenti disebabkan karena nutrisi di dalam molase telah berkurang. Kematian bakteri disebabkan karena zat makanan yang diperlukan berkurang (Dwijoseputro, 2003). Untuk mengetahui fase log akhir dan fase kematian bakteri *Bacillus megaterium*, maka dibuat pola pertumbuhan dari data jumlah sel pada media molase serta media NB (kontrol) yang diukur menggunakan metode hitungan cawan.

Pola pertumbuhan bakteri *Bacillus megaterium* di dalam media NB tidak menunjukkan fase lag. Sel bakteri membutuhkan nutrisi yang cukup untuk membelah sehingga perkembangbiakannya akan meningkat. Jika nutrisi yang diperlukan bakteri telah terpenuhi maka bakteri akan membelah menjadi dua kali. Peningkatan jumlah sel terjadi pada minggu ketiga. Fase log akhir bakteri ini dicapai minggu kelima. Pada fase ini, log jumlah bakteri mencapai 11,65 atau setara dengan $4,5 \times 10^{11}$ CFU/ml. Fase stasioner terjadi pada minggu keempat hingga minggu ketujuh. Minggu kedelapan hingga minggu kedua belas merupakan fase kematian. Fase ini ditandai dengan menurunnya jumlah sel secara drastis akibat dari berkurangnya nutrisi sehingga bakteri mengalami kematian. Pada media perlakuan yang mengandung molase 0% atau kontrol, bakteri dapat bertahan hidup selama masa inkubasi akhir disebabkan adanya nutrisi kompleks dari media NB yang dibutuhkan bakteri. NB termasuk dalam media kompleks karena mengandung beberapa jenis nutrisi (Anonim, 2012).

Pola pertumbuhan bakteri *Bacillus megaterium* dengan konsentrasi molase 1% tidak menunjukkan fase lag. Fase log terjadi ketika minggu kedua hingga minggu keenam yang ditandai sel membelah dengan laju konstan. Fase log akhir dicapai pada minggu keenam dengan log jumlah bakteri mencapai 11 atau setara dengan $1,0 \times 10^{11}$ CFU/ml. Fase stasioner yang ditandai dengan jumlah sel yang seimbang antara laju kematian dengan laju kehidupan ditemukan pada kelima hingga kesembilan. Fase kematian terjadi pada minggu kesembilan ditandai dengan jumlah sel yang semakin menurun dan mengalami kematian.

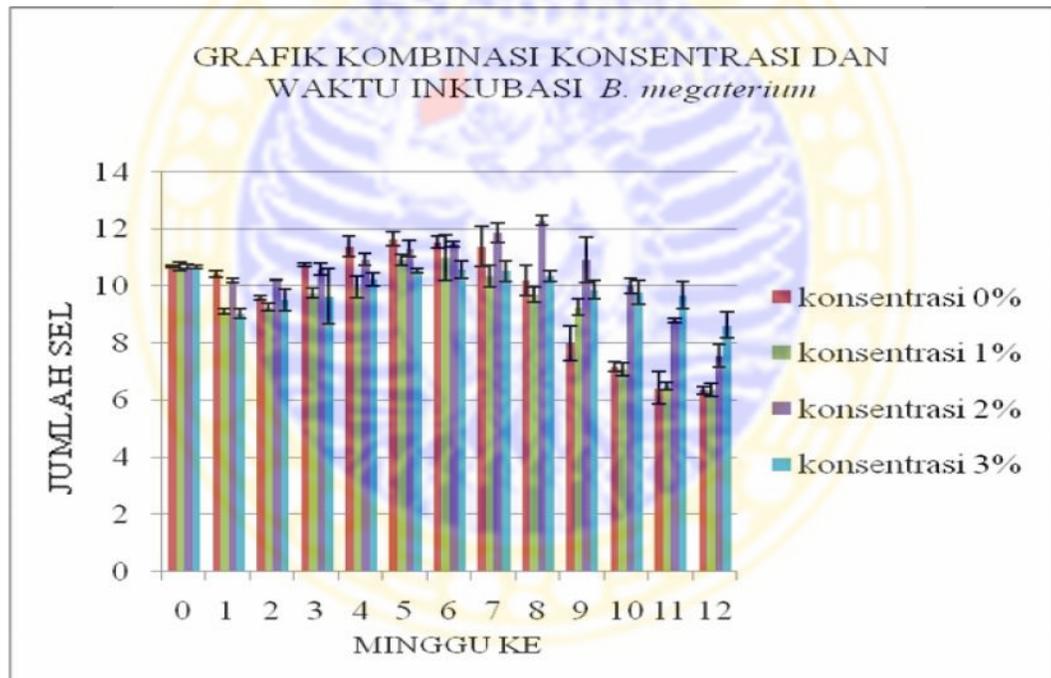
Pola pertumbuhan bakteri *Bacillus megaterium* pada konsentrasi molase 2% tidak menunjukkan terjadinya fase lag. Fase log dimulai ketika minggu ketiga ditunjukkan dengan meningkatnya garis pada pola pertumbuhan yang mengindikasikan bahwa jumlah sel meningkat. Fase log akhir terjadi pada minggu kedelapan dengan log (jumlah sel) sebesar 12,3 atau setara dengan $2,0 \times 10^{12}$ CFU/ml. Pada fase log ini, keadaan pertumbuhannya meningkat dan akhirnya mengalami fase kematian pada minggu kesembilan.

Pola pertumbuhan bakteri *Bacillus megaterium* pada konsentrasi molase 3% tidak menunjukkan fase lag atau fase adaptasi. Pada minggu kedua, sel mengalami pembelahan sehingga perkembangbiakan meningkat dan dikatakan sebagai fase log. Fase log akhir terjadi pada minggu keenam dengan log (jumlah sel) sebesar 10,57 atau setara dengan $3,7 \times 10^{10}$ CFU/ml. Fase stasioner terjadi pada minggu kelima hingga kesebelas sedangkan fase kematian terjadi pada minggu keduabelas.

Pada variasi konsentrasi molase menunjukkan pola pertumbuhan yang berbeda. Adanya perbedaan pola pertumbuhan bakteri *Bacillus megaterium* pada variasi konsentrasi molase menunjukkan bahwa komposisi media berperan penting dalam pertumbuhan *Bacillus megaterium*. Perbedaan yang kecil pada nutrisi yang tersedia memungkinkan terjadinya perubahan akibat keterbatasan nutrisi dan berpengaruh terhadap pembentukan sel mikroorganisme (Jenny, *et al.*, 1993 dalam Hidayanti, 2005 dalam khurorin, 2006). Untuk meningkatkan pertumbuhan bakteri dapat dilakukan dengan cara menstimulasi secara selektif pertumbuhannya dengan mensuplai nutrisi dengan kandungan bahan yang dapat dimetabolisme oleh bakteri dalam jumlah atau konsentrasi tertentu (Moller *et al.*, 2001 dalam Hidayanti, 2005 dalam Khurorin, 2006). Pertumbuhan bakteri pada konsentrasi molase 2% meningkat setiap masa inkubasi. Hal ini ditunjukkan pada fase log akhir dengan jumlah paling tinggi dibandingkan dengan konsentrasi molase lainnya yaitu $2,0 \times 10^{12}$ CFU/ml tetapi pada konsentrasi molase ini menunjukkan fase kematian yang lebih cepat dibandingkan dengan konsentrasi molase 3%. Pola pertumbuhan pada konsentrasi molase 3% menunjukkan fase kematian yang lebih lambat dibandingkan dengan konsentrasi molase lain. Jumlah sel bakteri pada konsentrasi molase 3% lebih banyak di akhir inkubasi dibandingkan dengan konsentrasi molase lain. Hal ini disebabkan karena tersedianya sumber karbon pada konsentrasi molase 3% sehingga jumlah sel belum mengalami kematian. Pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *Bacillus* 3KP membutuhkan konsentrasi 3% pada substrat molase (Thoha, 2010). Hal ini menunjukkan bahwa nutrisi mempengaruhi pertumbuhan. Semakin nutrisi di

dalam media berkurang maka jumlah sel semakin menurun. Kisaran pH pada konsentrasi molase 3% yaitu 4-7. Kisaran tersebut masih berada dalam kisaran optimum bakteri *Bacillus megaterium* beradaptasi dengan media. pH optimum *B. megaterium* yaitu 5,5-8 (Belma, 2000).

4.2 Pengaruh Kombinasi Konsentrasi Molase dan Waktu Inkubasi terhadap Jumlah Sel Bakteri Probiotik *Bacillus megaterium*



Gambar 4. Kombinasi konsentrasi dan waktu inkubasi terhadap jumlah sel (log) *B. megaterium*

Data nilai jumlah sel *Bacillus megaterium* dengan perlakuan kombinasi konsentrasi molase dengan waktu inkubasi harus diuji terlebih dahulu normalitas dan homogenitasnya. Data dianalisis secara statistik dengan menggunakan *Kolmogorov-Smirnov Test* untuk mengetahui apakah suatu data berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan bahwa jumlah sel berdistribusi normal. Kemudian homogenitas suatu data dianalisis dengan menggunakan *Levene's Test* untuk mengetahui variansi data. Hasil *Levene's Test* menunjukkan bahwa data tidak homogen (Lampiran 1).

Hasil dari *Kolmogorov-Smirnov Test* dan *Levene's Test* menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan tidak homogen, maka dapat dilanjutkan dengan menggunakan uji *Brown Forsythe* untuk mengetahui pengaruh konsentrasi molase, waktu inkubasi serta kombinasi konsentrasi molase dengan waktu inkubasi terhadap jumlah sel. Bila hasil uji *Brown Forsythe* menunjukkan angka signifikansi ($\alpha < 0,05$) maka dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara perlakuan.

4.2.1 Pengaruh konsentrasi molase terhadap jumlah sel *Bacillus megaterium*

Pengaruh konsentrasi molase terhadap jumlah sel dapat diketahui dengan menggunakan *Brown Forsythe Test*. Data menunjukkan bahwa nilai signifikansi dibawah 0,05 yaitu 0,001 (Lampiran 2). Hal ini menunjukkan bahwa H_0 ditolak, artinya ada pengaruh konsentrasi molase terhadap jumlah sel bakteri *Bacillus megaterium*. Perbedaan antara perlakuan dapat diketahui dengan menggunakan uji *Games Howll*.

Hasil uji statistik signifikansi konsentrasi molase terhadap jumlah sel dengan uji *Games Howll* menunjukkan bahwa jumlah sel pada konsentrasi molase 1% berbeda signifikan dengan konsentrasi molase 2% sedangkan konsentrasi molase 2% berbeda signifikan dengan konsentrasi molase 3% (Lampiran 5). Artinya jumlah sel pada konsentrasi molase 1% memiliki pengaruh yang berbeda dengan konsentrasi molase 2% sedangkan konsentrasi molase 2% memiliki pengaruh yang berbeda dengan konsentrasi molase 3%.

4.2.2 Pengaruh waktu inkubasi terhadap jumlah sel *Bacillus megaterium*

Pengaruh waktu inkubasi terhadap jumlah sel menunjukkan nilai signifikansi dibawah 0,05 yaitu 0,000 pada uji *Brown Forsythe Test* (Lampiran 3). Hal ini menunjukkan bahwa H_0 ditolak, artinya ada pengaruh waktu inkubasi terhadap jumlah sel bakteri *Bacillus megaterium*. Perbedaan antara perlakuan dapat diketahui dengan menggunakan uji *Games Howll*.

Hasil uji statistik signifikansi waktu inkubasi terhadap jumlah sel dengan uji *Games Howll* menunjukkan bahwa data pengaruh waktu inkubasi terhadap jumlah sel berbeda signifikan, artinya data waktu inkubasi memiliki pengaruh yang berbeda terhadap jumlah sel. Data perbedaan signifikan dapat dilihat pada lampiran 5.

4.3.3 Pengaruh kombinasi konsentrasi molase dan waktu inkubasi terhadap jumlah sel *Bacillus megaterium*

Nilai signifikansi kombinasi konsentrasi molase dan waktu inkubasi terhadap jumlah sel pada uji *Brown Forsythe* kurang dari 0,05 yaitu 0,001 (Lampiran 4). Karena nilai signifikansi kombinasi konsentrasi molase dan waktu inkubasi terhadap jumlah sel dibawah derajat signifikansi ($\alpha < 0,05$), maka keputusan yang diambil adalah tolak H_0 yang artinya ada pengaruh kombinasi konsentrasi molase dan waktu inkubasi terhadap jumlah sel bakteri *Bacillus megaterium*.

Hasil analisis statistik signifikansi antara data kombinasi konsentrasi molase dan waktu inkubasi terhadap jumlah sel dengan uji *Games Howll* menunjukkan bahwa beberapa data kombinasi konsentrasi molase dan waktu inkubasi berbeda signifikan. Konsentrasi molase 3% pada minggu keduabelas berbeda signifikan dengan konsentrasi molase 0% pada minggu keempat hingga keenam, konsentrasi molase 2% minggu keempat, ketujuh dan kedelapan, artinya konsentrasi molase 3% pada minggu keduabelas memiliki pengaruh yang berbeda dengan konsentrasi molase 0% pada minggu keempat hingga keenam, konsentrasi molase 2% minggu keempat, ketujuh dan kedelapan. Data perbedaan signifikan yang lainnya dapat dilihat pada lampiran 6.

4.3 Viabilitas Bakteri Probiotik *Bacillus megaterium* di Akhir Inkubasi pada Variasi Konsentrasi Molase

Kadaluarsa suatu produk di akhir inkubasi disebabkan karena jumlah bakteri di dalam media memenuhi standar jumlah minimum untuk probiotik. Standar jumlah minimum bakteri digunakan sebagai probiotik yaitu lebih dari 10^6 . *International Dairy Federation* (IDF) memberikan standar jumlah minimum probiotik hidup sebagai acuan adalah 10^6 CFU/ml pada produk akhir (Indratingsih, 2004). Namun standar jumlah minimum ini bukan merupakan dosis efektif probiotik karena bersifat spesifik tergantung pada kemampuan probiotik untuk bertahan dan berpenetrasi pada saluran pencernaan inang (Nousiainen, *et al.*, 2004 dalam Salminen *et al.*, 2004). Jumlah bakteri di bawah standar jumlah minimum disebabkan karena kematian jumlah sel. Kematian jumlah sel dipengaruhi oleh pH, nutrisi dan konsentrasi nutrisi. Menurut Hudaya dan Daradjat (1980), mengatakan bahwa keadaan yang dapat mempengaruhi aktivitas pertumbuhan mikroorganisme yaitu lingkungan yang sangat menguntungkan bagi tersedianya zat makanan untuk mikroorganisme.

Jumlah sel *Bacillus megaterium* di akhir inkubasi pada media konsentrasi molase 1%, 2% dan 0% lebih sedikit jika dibandingkan dengan jumlah sel pada konsentrasi molase 3%. Hal ini disebabkan karena ketersediaan substrat pada konsentrasi molase 3% lebih banyak dibandingkan dengan konsentrasi molase 1%, 2% dan 0%. Pertumbuhan bakteri biasanya dibatasi oleh ketersediaan nutrisi seperti karbon organik, nitrogen dan fosfor (Peterson, *et al.*, 2005; Camper, *et al.*, 1991

dalam Sutapa dkk., 2007 *dalam* khurorin, 2006). Keempat konsentrasi tersebut masih memenuhi standar jumlah minimum digunakan sebagai probiotik disebabkan karena jumlah sel *Bacillus megaterium* pada keempat konsentrasi diatas 10^6 CFU/ml. Berdasarkan pembahasan di atas maka viabilitas bakteri probiotik *Bacillus megaterium* pada variasi konsentrasi molase tersebut dikatakan masih baik dan dapat digunakan sebagai probiotik dengan masa inkubasi 3 bulan.

