

Identifikasi Morfologi dan Uji Aktivitas Antimikroba Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Dari Fermentasi Buah Markisa (*Passiflora sp.*)

Habibi Hidayat

Program Studi Kimia FMIPA Universitas Islam Indonesia

Jalan Kaliurang KM 14,5, Sleman, Yogyakarta, 55584

E-mail: habibihidayat13@gmail.com

ABSTRAK

Telah dilakukan studi identifikasi bakteri dari buah Markisa dan uji aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli*. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari buah Markisa, dimana penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi morfologi bakteri yang tumbuh dalam proses fermentasi buah markisasecara mikroskopik, dan uji aktivitas antimikroba dari hasil fermentasi Markisa (*Passiflora Sp.*) terhadap bakteri *Escherichia coli*. Identifikasi morfologi yang dilakukan dengan metode pewarnaan Gram dan uji aktivitas antimikroba dengan menggunakan metode cakram. Hasil yang diperoleh dari terhadap kedua isolat yaitu S1 berbentuk basil dan S2 berbentuk basil dan kokus. Perhitungan jumlah koloni pada pengenceran 10^{-7} diperoleh S1 sebanyak 16.10^7 cfu/ml dan S2 sebanyak 30.10^7 cfu/ml. Uji aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* selama 1 x 72 jam yaitu isolat S1 diperoleh zona hambat pertumbuhan bakteri sebesar 11 mm, 13 mm dan 15 mm dan isolat S2 sebesar 13 mm, 14 mm dan 16 mm.

Kata kunci: *Markisa, Escherichia coli, Antimikroba, Pewarnaan Gram*

ABSTRACT

Study of morphological identification and testing of antimicrobial activity for passionfruit isolates have been done against *Escherichia coli*. Examined Samples were taken from passionfruit, where This study aims to find out morphology identification of the isolates microscopically and antimicrobial activity of Passionfruit (*Passiflora sp.*) fermentation against *Escherichia coli* bacteria. The identification of morphology was conducted using Gram staining method while testing of antimicrobial activity was performed using cakram method. Obtained results from the two isolates showed that the shape of S1 was basil and the shape of S2 was basil and coccus. Collony calculation in the 10^{-7} dilution exhibited the number of S1 was 16.10^7 cfu / ml and S2 was 30.10^7 cfu / ml. Testing of antimicrobial activity against pathogenic bacteria *Escherichia coli* at 1 x 72 hours of S1 isolate gave inhibition zones for bacterial growth of 11 mm, 13 mm and 15 mm. At the same, S2 isolate gave inhibition zones of 13 mm, 14 mm and 16 mm.

Key words: *Passionfruit, Escherichia coli, antimicrobial, Gram Staining*

Pendahuluan

Markisa merupakan salah satu jenis buah yang terdapat di Indonesia. Buah ini

berasal dari negara Brasil, dan berkembang pesat di beberapa daerah di Indonesia seperti di Sumatera Utara,

Sumatera Barat, Lampung, dan Sulawesi Selatan. Selain itu, Markisa juga dapat diperoleh dengan mudah di daerah Yogyakarta. Buah Markisa memiliki banyak manfaat bagi kesehatan karena memiliki kandungan nutrisi yang berkhasiat. Buah Markisa identik mempunyai rasa masam sehingga jarang dimanfaatkan secara langsung dan hanya dibuat sebagai bahan minuman (Overlando, dkk., 2013). Markisa merupakan sumber serat untuk membersihkan dinding usus, meningkatkan pencernaan, dan membantu mencegah serangan jantung dan stroke.

Biasanya suatu mikroba hanya dapat menimbulkan penyakit jika berhasil masuk ke dalam tubuh melalui saluran tertentu, misalnya dengan melalui saluran pencernaan. Mikroba yang dapat menginfeksi dan menimbulkan penyakit adalah mikroorganisme yang mempunyai daya patogenitas yang tinggi, daya virulensi yang kuat, daya invasi yang tinggi sehingga dapat berkembang biak dan menyebar ke dalam tubuh inang yang peka, serta mempunyai daya pertahanan dan daya hindar yang baik terhadap serangan sel-sel fagosit di dalam tubuh inang. Menurut Tagg, bakteri gram positif bersifat bakterisida tidak hanya membunuh bakteri, bukan hanya

menghambat, sebagai akibat lemahnya *proton motive force* dan hilangnya kemampuan potensi membran dalam mencegah pertumbuhan bakteri sejenis dan mempunyai tempat pelekatan yang spesifik bagi bakteri patogen (Hidayat, 2011).

Fermentasi adalah reaksi dengan menggunakan biokatalis untuk mengubah bahan baku menjadi produk. Biokatalis yang digunakan adalah bakteri, *yeast* atau jamur (Overlando, dkk., 2013). Secara umum, makanan fermentasi lebih awet dari bentuk segarnya karena kondisi asam tidak disukai oleh bakteri kontaminan. Disamping itu, makanan fermentasi cita rasanya lebih enak dibanding bentuk segarnya, dan nilai gizinya lebih tinggi, umumnya lebih mudah dicerna karena telah mengalami penguraian selama proses fermentasi dan terbentuk molekul-molekul yang lebih sederhana dan lebih mudah dicerna (Surono, 2004). Menurut Overlando, dkk., (2013), beberapa langkah utama yang diperlukan dalam melakukan proses fermentasi, yaitu :

- a. Seleksi mikroba atau enzim yang sesuai dengan tujuan.
- b. Seleksi media sesuai dengan tujuan.
- c. Sterilisasi semua bagian penting untuk mencegah kontaminasi.

- d. Pengecekan semua perlengkapan terutama pada bagian pengendalian proses.
- e. Evaluasi hasil maupun proses secara menyeluruh.

Melihat kandungan dan manfaat yang terdapat di dalam buah markisa, Selain dibuat minuman, apakah markisa juga dapat digunakan sebagai antimikroba maka dilakukan identifikasi morfologi dan uji aktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli* dari hasil fermentasi buah Markisa. Pada penelitian sebelumnya banyak yang melakukan uji aktivitas dengan menggunakan sampel yang berbeda. Sehingga peneliti tertarik untuk melakukan penelitian terhadap buah markisa.

Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui identifikasi morfologi secara mikroskopik dari bakteri hasil fermentasi Markisa (*Passiflora Sp.*).
2. Untuk mengetahui aktivitas antimikroba dari fermentasi Markisa (*Passiflora Sp.*) terhadap bakteri *Escheria coli*.

Metode Penelitian

Penelitian ini membutuhkan bahan-bahan seperti: buah Markisa kuning,

alkohol 70%, indikator kertas pH universal, *nutrient agar*, *nutrient broth*, *pepton water*, kristal violet, larutan lugol, aseton alkohol, safranin, *Mueller hilton*, antibiotik (*eritrombisin*, *ampicilin*), akuades, kertas saring, kapas, *Euschericia coli*, kertas aluminium foil, kertas wrap

Alat-alat yang digunakan yakni *autoclave*, rak tabung reaksi, *petridish*, jarum ose, pembakar bunsen, erlemeyer, pipet mikro, mikroskop, kaca objek, *stopwatch*, *vortex*, *microtube*, inkubator.

Prosedur Kerja

A. Fermentasi Buah Markisa

Proses fermentasi Markisa Kuning dilakukan dengan mengambil satu atau dua buah Markisa yang sudah matang kemudian di kupas dan letakkan ke dalam daun pisang yang telah di bersihkan dengan alkohol dan dipanaskan lalu ditutup rapat-rapat, kemudian dimasukkan ke dalam *tupper wearyang* telah di lubangi dan di diamankan selama 36 jam dan 48 jam pada suhu kamar.

B. Isolasi dan identifikasi Morfologi Bakteri

Hasil Fermentasi 36 jam dan 48 jam di ambil dan dilakukan proses isolasi. Isolasi dilakukan dengan cara

pengenceran. Dimana dalam proses pengenceran tersebut sebanyak 1 gram daging buah markisa hasil fermentasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml *nutrient broth* cair. Perlakuan ini dilakukan sama untuk masing-masing sampel yang 36 jam dan 48 jam. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Setelah diinkubasi dilakukan pengenceran bertingkat. Dengan menggunakan *pepton water*. Sebanyak 0,9 ml *pepton water* masing-masing dimasukkan ke dalam 7 buah *microtube*, selanjutnya satu buah *microtube* tersebut ditambahkan dengan 0,1 ml hasil fermentasi. Kemudian *microtube* tersebut di *vortex* selama 30 detik lalu di ambil 0,1 ml dan dimasukkan ke dalam *microtube* berikutnya. Perlakuan ini terus dilakukan sampai *microtube* terakhir. Setelah itu *microtube* yang terakhir (ke 7) diambil 0,1 ml dan dilakukan penanaman pada media padat. Media padat yang dibuat dari 2 gram *nutrient agar* dengan 0,8 gram *nutrient broth* dalam 100 ml akuades. Selanjutnya diratakan dengan menggunakan *dirglassky*, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Selanjutnya dilakukan penanaman menggunakan metode *streak zigzag* dengan mengambil 1 ose hasil inkubasi

ditanam pada media padat yang baru dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

C. Identifikasi Morfologi Bakteri

Dari media padat yang telah diinkubasi tadi diambil 1 ose bakteri lalu diletakkan di atas kaca objek, dilebarkan dan dilakukan fiksasi bakterinya. Selanjutnya dituangkan kristal violet sebanyak 3-5 tetes selama 5 menit. Lalu dicuci dengan air mengalir, ditambahkan lugol dan diamkan selama 45-60 detik kemudian cuci lagi dengan air mengalir. Selanjutnya celupkan dalam bejana yang berisi aseton alkohol sambil digoyang-goyangkan selama 30 detik. Kemudian dicuci lagi dengan air yang mengalir, kemudian warnai dengan safranin sebanyak 2-3 tetes selama 1-2 menit, dan dicuci dengan air yang mengalir lalu dikeringkan. Kemudian lihat bentuk morfologi bakteri dengan menggunakan mikroskop perbesaran 40X.

Uji Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan cara melakukan kultur bakteri menggunakan media cair *nutrient broth*. Sebanyak 1 ose bakteri dari media padat di kultur didalam media cair selama 24 jam pada suhu 37°C. Di siapkan juga 1 ml bakteri patogen *Escherichia coli* yang

dikultur di dalam media cair *nutrient broth*, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan proses persiapan media *Mueller hilton* (MH), diambil 2,28 gram MH ditambahkan 1,2 gram *nutrient agar* dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 60 ml. Dalam proses uji aktivitas antimikroba ini digunakan antibiotik sebagai standar yaitu *Eritromisin (E)* dan *Ampicillin (amp)*.

Pembahasan

A. Fermentasi Buah Markisa

Proses fermentasi dilakukan dari sampel buah markisa yang diperoleh di kota Yogyakarta. Dalam proses fermentasi dilakukan sterilisasi alat yang akan digunakan agar tidak terjadi kontaminasi terhadap bakteri. Adapun nilai pH yang diperoleh untuk masing-masing proses fermentasi dari 36 jam sebesar 3 dan untuk yang 48 jam sebesar 4 (Gambar 1). Pada awalnya pH sampel hasil sebesar 5. Penurunan pH dari masing-masing sampel selama proses fermentasi, disebabkan karena pada saat proses fermentasi terbentuk asam laktat, aroma, dan flavour yang dihasilkan dari kandungan buah markisa. Selain itu, menurut Surono (2004) dalam proses fermentasi mikroba akan menghasilkan

senyawa CO₂, asam asetat, etanol, manitol, dan senyawa flavour dari heksosa.



(a) (b) (c)

Gambar 1. Fermentasi Buah Markisa: (a) Buah Markisa; (b) Daging Buah Markisa (c) Proses Fermentasi

B. Isolasi dan identifikasi Morfologi Dari Bakteri

Isolasi bakteri ini dilakukan bertujuan untuk memisahkan dan membiakkan bakteri yang terdapat di dalam campuran dengan menggunakan media kultur sehingga diperoleh isolat bakteri atau biakan murni dari bakteri tersebut (Darwis dan Sukar, 1999). Pada proses isolasi ini media isolasi spesifik yang digunakan adalah media selektif yaitu *nutrient broth* atau *Mann Rogosa Sharpe Broth*. Bentuk medianya seperti bubuk berwarna kuning pucat. Media selektif ini digunakan untuk menumbuhkan dan memelihara bakteri tertentu, dengan sifat kekhususannya tersebut, maka media ini akan menyeleksi bakteri yang ingin ditumbuhkan yaitu Bakteri Asam Laktat (BAL).

Bakteri dalam sampel diisolasi dengan menggunakan metode pengenceran bertingkat dan *streak* pada MRS agar. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari. Proses pengenceran bertingkat dilakukan sampai 10^{-7} dalam pepton water. Hal ini bertujuan untuk memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan tersebut. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 1 hari pada suhu 37°C. Setelah dilakukan proses inkubasi maka didalam petridish yang berisi media padat akan terdapat sejumlah koloni-koloni bakteri. Koloni tunggal dari *petridish* tersebut selanjutnya dipindahkan ke dalam *petridish* lain dengan perlakuan yang sama dengan menggunakan metode *streak* agar mendapatkan kultur murni dari bakteri. Dari hasil *streak* tersebut diperoleh 2 isolat bakteri, yaitu S1 dan S2.

Dari hasil perhitungan jumlah koloni pada pengenceran 10^{-7} diperoleh S1 sebanyak $16 \cdot 10^7$ cfu/ml dan S2 sebanyak $30 \cdot 10^7$ cfu/ml (Gambar 2). Karena pada pengenceran tersebut koloni-koloni bakteri sudah terpisah dengan baik, jumlah total koloni ini memenuhi kriteria sebagai pangan probiotik. Menurut WHO (*World Health*

Organization) dalam Dewita (2010) sebagai pangan probiotik yaitu berada pada jumlah 10^6 - 10^8 cfu/ml.



Gambar 2. Penampakan BAL pada Medium MRS agar

C. Identifikasi Morfologi Bakteri

Isolat bakteri yang berhasil diisolasi menggunakan media selektif *nutrient broth* berdasarkan sifat-sifat umumnya adalah Bakteri Asam Laktat (BAL). Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan bakteri yang mampu menghasilkan asam laktat pada media pertumbuhannya. Sifat-sifat umum dari BAL antara lain : bentuknya basil (batang), kokus (bulat), sifat gram positif, katalase negatif, endospora negatif, motilitas negatif, dan mampu menghasilkan asam laktat. Identifikasi dilakukan terhadap kedua isolat yaitu S1 dan S2.

Identifikasi BAL secara makroskopis yang telah diamati diperoleh bentuk koloni (Tabel 2). Untuk mengetahui jenis bakteri yang dihasilkan maka dilakukan identifikasi secara mikroskopik yaitu dengan pewarnaan gram. Uji gram ini dilakukan untuk

mengelompokkan bakteri berdasarkan reaksi kimia yang terbagi menjadi dua yaitu Gram positif dan Gram negatif,

yang menggunakan larutan pewarna Gram (*Gram Staining*).

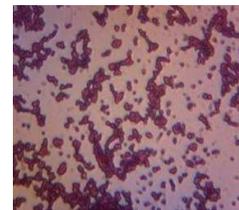
Tabel 2. Hasil Pengamatan Koloni

isolat	ukuran	bentuk	elevasi	bentuk pinggir	warna	uji gram
S1	kecil	teratur (sirkular)	datar	lobate	putih kekuning- kuningan	basil (gram positif)
S2	Sedang	Teratur (sirkular)	cembung	Bulat penuh	Putih	Basil dan kokus (gram positif)

Proses pewarnaan Gram yang telah dilakukan akan menghasilkan bentuk morfologi dari bakteri tersebut (Gambar 3). Menurut Prescott *et al* dalam Hidayat (2011), ketika sel bakteri yang terdapat pada kaca objek ditambahkan dengan pewarna kristal violet yang berwarna ungu, maka sel bakteri akan menyerap pewarna tersebut. Interaksi antara sel bakteri dengan kristal violet akan semakin kuat dengan ditambahkan lugol. Ketika dicuci dengan alkohol, bakteri Gram positif akan tetap mengikat kompleks kristal violet-lugol sehingga menjadi berwarna ungu. Sedangkan bakteri Gram negatif akan kehilangan kompleks kristal violet lugol karena lapisan peptidoglikan pada bakteri Gram negatif lebih tipis sehingga menjadi tidak berwarna. Ketika ditambahkan dengan safranin yang berwarna merah maka

Identifikasi Morfologi dan Uji Aktivitas Antimikroba Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Dari Fermentasi Buah Markisa (*Passiflora sp.*)
(Habibi Hidayat)

bakteri Gram negatif akan menyerapnya sedangkan bakteri Gram positif tidak akan menyerap pewarna lagi. Dalam proses pewarnaan Gram ini sampel kultur bakteri dari masing-masing isolat yang digunakan adalah sampel kultur bakteri yang masih segar dan muda.



Gambar 3. Bentuk Isolat Bakteri Hasil Pewarnaan Gram

Dari hasil Pewarnaan Gram untuk kedua sampel isolat bakteri semuanya diperoleh bakteri Gram positif, untuk S1 berbentuk basil dan S2 berbentuk basil dan kokus. Pewarnaan Gram pada bakteri ini didasarkan pada tebal atau tipisnya

lapisan peptidoglikan di dinding sel dan banyak sedikitnya lemak pada membran sel bakteri. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan membran sel selapis serta tidak memiliki membran luar. Sedangkan bakteri Gram negatif mempunyai dinding sel tipis yang berada diantara dua lapis membran sel.

D. Uji Aktivitas Antimikroba

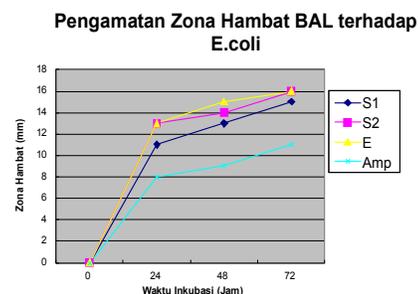
Uji aktivitas antimikroba dilakukan untuk kedua jenis sampel isolat S1 dan S2 dengan menggunakan metode difusi cakram. Metode difusi cakram merupakan suatu metode yang banyak digunakan dalam proses uji aktivitas antimikroba, metode ini biasa dikenal sebagai metode Kirby-Bauer. Dimana dalam prosesnya sejumlah bakteri uji diinokulasikan pada media agar dan cakram yang mengandung larutan uji. Cakram yang telah mengandung sampel bakteri uji diletakkan pada permukaan media agar yang telah memadat. Dimana sebelumnya padatan dari media di olesi bakteri patogen *Escherichia coli*. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Pada 24 jam pertama setelah diinkubasi menunjukkan hasil yang positif pada kedua isolat yaitu dengan adanya zona hambat disekitar cakram sebagai daerah bening yang tidak ditumbuhi bakteri patogen. Menurut Suriawiria dalam

Mardiana (2007) pengukuran kekuatan antibiotik dan antibakteri dengan menggunakan metode Davis Stout dapat dibagi menjadi beberapa kategori (Tabel 2).

Tabel 2. Klasifikasi Respon Zona Hambat

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Pertumbuhan
≤5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
10-20 mm	Kuat
≥20 mm	Sangat Kuat

Dari hasil uji aktivitas antimikroba yang telah dilakukan terhadap kedua isolat. Daerah hambat yang terbentuk terlihat sebagai daerah terang atau bening disekeliling sumur yang kemudian diukur besarnya dengan menggunakan penggaris. Adapun hasil pengamatan zona bening dapat dilihat dari grafik dibawah ini.



Dari grafik diatas dapat dilihat bahwa kemampuan isolat S1 dan S2

dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Escherichia coli* berbeda-beda. Dimana dari isolat S1 diperoleh zona hambat pertumbuhan bakteri sebesar 11 mm, 13 mm dan 15 mm (Gambar 4). Hasil yang diperoleh untuk isolat S1 ini masuk ke dalam kategori respon hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yang kuat, sedangkan pada isolat S2 memiliki zona hambat terbesar dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Escherichia coli* pada setiap pengamatan 24 jam selama 3 hari yaitu sebesar 13 mm, 14 mm dan 16 mm. Respon zona hambat untuk isolat S2 ini juga masuk ke dalam kategori respon hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yang kuat. Akan tetapi sampel S2 memiliki zona hambat yang lebih baik daripada sampel S1.

Dalam proses uji aktivitas antimikroba ini juga digunakan dua buah antibiotik standar yaitu eritromisin dan ampisilin. Dari grafik di atas terlihat bahwa kemampuan tertinggi dari kedua antibiotik dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* adalah antibiotik eritromisin yaitu sebesar 13 mm, 15 mm, dan 16 mm. Pada setiap jam eritromisin memiliki kestabilan dalam melawan *Escherichia coli*, dan merupakan antibiotik yang lebih baik dari pada ampisilin karena hasil pengamatan zona

hambat dari ampisilin lebih kecil bila dibandingkan dengan kedua isolat dan antibiotik E, yaitu sebesar 8 mm, 9 mm, dan 11 mm.



Gambar 4. Uji Aktivitas Antimikroba

Sehingga dapat dilihat bahwa semua isolat masih efektif dan baik dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* selama 72 jam. Oleh sebab itu, jika diaplikasikan sebagai obat antibiotik alami maka dapat dilakukan 1x 48 jam agar efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Kesimpulan

Hasil penelitian memberikan kesimpulan:

1. Isolat S1 dan S2 yang diperoleh dari fermentasi buah Markisa adalah uji gram positif yang berbentuk basil dan basil kokus.
2. Uji aktivitas antimikroba untuk masing-masing isolat diperoleh nilai yang bervariasi selama tiga hari, yaitu untuk S1 sebesar 11 mm, 13 mm, dan

15 mm. Sedangkan S2 sebesar 13 mm, 14 mm, dan 16 mm.

Pustaka

- Darwis dan Sukara. 1999. *Isolasi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim*. Bogor : IPB
- Dewita, Sri M. 2010. *Identifikasi Bakteri Asam Laktat yang diisolasi dari Biskuit Blondo Yang Berpotensi Menghambat Bakteri Patogen*. Padang: Universitas Andalas
- Hidayat, Habibi. 2011. *Karakterisasi Molekuler BAL Dengan Gen 16S rRNA Penghasil ENzim Protease Yang berpotensi sebagai Probiotik Dari Fermentasi Markisa Kuning di Sumatera Barat*. Padang: Universitas Andalas
- Mardiana, 2007. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun dan Biji Kecubung (Datura metel L) Terhadap Bakteri Escherichia coli dan Bacillus cereus*. Bengkulu: UNIB
- Overlando, Redho dkk. 2013. *Fermentasi Buah Markisa (Passiflora) menjadi Asam Sitrat*. Palembang: Universitas Sriwijaya
- Surono, Ingrid S. 2004. *Probiotik Susu Fermentasi Dan Kesehatan*. Jakarta: PT. Tri Cipta Karya (TRICK)