

ARTIKEL

PENGARUH pH, SUHU DAN WAKTU INKUBASI ANTIBAKTERI YANG DIHASILKAN *Lacticaseibacillus rhamnosus* KBJ TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus aureus*

[*The Effect of pH, Temperature and Incubation Time of Antibacterials Produced by Lacticaseibacillus rhamnosus KBJ on The Growth of Escherichia coli and Staphylococcus aureus Bacteria*]

Sharfina Maulidayanti^{1*}, Anjelika Puja Lestari¹, Ing Mayfa Br Situmorang², Asbar Tanjung¹, Maria F Menang¹

¹Departemen Teknologi Laboratorium Medis, Stikes Prima Indonesia

²Program Studi Farmasi, Stikes Medistra Indonesia

ABSTRAK

Lacticaseibacillus rhamnosus adalah bakteri gram positif yang dapat menghasilkan senyawa antibakteri seperti bakteriosin dan peptida yang dapat menghambat pertumbuhan patogen. Salah satu patogen infeksi yang menyerang organ manusia adalah bakteri dan yang paling umum ditemukan pada manusia yaitu bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Tujuan penelitian untuk mengetahui pengaruh pH, suhu, dan waktu inkubasi antibakteri yang dihasilkan *Lacticaseibacillus rhamnosus* KBJ terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Desain penelitian ini secara eksperimental dengan metode difusi sumuran. Populasi pada penelitian ini adalah *Lacticaseibacillus*, dan bakteri patogen. Sampel yang digunakan adalah isolat *Lacticaseibacillus rhamnosus* KBJ, *E. coli* dan *S. aureus*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pH optimum untuk aktivitas antibakteri tertinggi adalah pH 5 dan suhu optimum untuk aktivitas antibakteri tertinggi adalah 40°C baik terhadap *S. aureus* maupun *E. coli*, waktu inkubasi terbaik untuk produksi antibakteri yaitu pada *S. aureus* adalah 24 jam dan *E. coli* 12 jam. Aktivitas antibakteri yang dihasilkan *Lacticaseibacillus rhamnosus* KBJ menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan *E. coli* lebih besar dibanding *S. aureus*.

Kata Kunci: Difusi Sumuran, *Escherichia coli*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* KBJ, Resistensi antibiotik, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Lacticaseibacillus rhamnosus is a gram-positive bacterium that can produce antibacterial compounds such as bacteriocins and peptides that can inhibit the growth of pathogens. One of the infectious pathogens that attack human organs is bacteria, with the most commonly found in humans being *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*). The aim of this study was to investigate the effect of pH, temperature, and incubation time on the antibacterial activity produced by *Lacticaseibacillus rhamnosus* KBJ against the growth of *E. coli* and *S. aureus*. The study design was experimental using the well diffusion method. The population in this study was *Lacticaseibacillus* and pathogenic bacteria. The samples used were isolates of *Lacticaseibacillus rhamnosus* KBJ, *E. coli*, and *S. aureus*. The results showed that the optimal pH for the highest antibacterial activity was pH 5, and the optimal temperature for the highest antibacterial activity was 40°C for both *S. aureus* and *E. coli*. The best incubation time for antibacterial production was 24 hours for *S. aureus* and 12 hours for *E. coli*. The antibacterial activity produced by *Lacticaseibacillus rhamnosus* KBJ demonstrated a greater ability to inhibit the growth of *E. coli* compared to *S. aureus*.

Keywords: Disc Diffusion, *Escherichia coli*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* KBJ, Antibiotic Resistance, *Staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

Negara dengan iklim tropis seperti Indonesia yang menjadi penyebab utama penyakit adalah infeksi. Curah hujan yang tinggi dan kondisi lembab membantu pertumbuhan mikroba. Pada negara dengan iklim tropis seperti Indonesia, penyebab utama penyakit adalah infeksi. Salah satu patogen infeksi yang menyerang organ manusia adalah bakteri dan yang paling umum ditemukan yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Azis, 2015). Antibiotik dapat membunuh bakteri atau menghentikan pertumbuhannya, mencegah dan mengobati infeksi bakteri. Namun, perilaku yang tidak tepat dalam penggunaan antibiotik dapat menyebabkan risiko resistensi antibiotik dimana bakteri beradaptasi dan menjadi kebal terhadap antibiotik tersebut (Syafitri *et al.*, 2024). Masalah resistensi antibiotik sekarang menjadi masalah global. Berdasarkan *Institut for Health Metrics and Evaluation* (2022) pada tahun 2019, ada 4,95 juta orang didunia yang meninggal karena menderita infeksi yang resistan terhadap obat. Dari jumlah tersebut, 1,27 juta kematian secara langsung disebabkan oleh resistensi antimikroba. Indonesia memiliki tingkat kematian tertinggi ke-78 dari 204 negara terkait resistensi antimikroba pada tahun 2019 dan mencatat sebanyak 34.500 kematian yang secara langsung disebabkan oleh resistensi antimikroba, 133.800 kematian yang terkait dengan resistensi antimikroba. Ini mencakup kematian akibat infeksi yang disebabkan oleh patogen yang resisten terhadap obat (*Institute for Health Metrics and Evaluation*, 2022). Meningkatnya kasus resistensi terhadap antibiotik mendorong perlunya pengembangan alternatif pengobatan yang lebih efektif. Salah satu pendekatan yang dapat digunakan adalah pemanfaatan senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL). BAL merupakan kelompok bakteri yang mampu melakukan fermentasi terhadap karbohidrat atau gula sederhana menjadi asam laktat dalam jumlah tinggi. Di samping itu, BAL juga memproduksi senyawa 2 bioaktif berupa bakteriosin, yaitu peptida dengan sifat antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen, termasuk strain yang telah menunjukkan resistensi terhadap antibiotik konvensional. Dalam berbagai studi, bakteriosin yang dihasilkan oleh genus *Lactocaseibacillus* menjadi fokus utama penelitian karena potensinya sebagai agen antimikroba alami yang menjanjikan (Vieco-Saiz, 2019). *Lactocaseibacillus rhamnosus* (*Ls. rhamnosus*) KBJ dikenal memiliki manfaat kesehatan dan secara luas digunakan sebagai agen antibakteri. Bakteri gram positif ini mampu memproduksi senyawa antimikroba, termasuk bakteriosin dan peptida, yang berfungsi menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen di saluran pencernaan. Selain aktivitas antibakterinya, *Ls. rhamnosus* juga memiliki kemampuan imunomodulator, yakni dapat merangsang sistem imun inang sehingga memperkuat respons terhadap infeksi yang disebabkan oleh *E. coli* dan *S. aureus*. Keunggulan lainnya adalah kemampuannya untuk bertahan dalam kondisi asam. Hal ini berkaitan dengan kemampuan *Ls. rhamnosus* dalam memproduksi asam laktat, yang menurunkan pH lingkungan dan menciptakan kondisi yang tidak menguntungkan bagi pertumbuhan bakteri patogen tersebut (Peng *et al.*, 2022). *E. coli* merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan berbagai jenis infeksi, termasuk diare, pneumonia, infeksi saluran kemih, meningitis, serta kasus keracunan makanan. Di sisi lain, *S. aureus* adalah bakteri gram positif yang umumnya ditemukan sebagai flora normal (komensal) pada rongga hidung dan permukaan kulit manusia, meskipun dalam kondisi tertentu dapat menjadi patogen oportunistik. Namun, bakteri ini juga mampu menghasilkan enterotoksin yang berperan dalam menyebabkan keracunan makanan, dengan manifestasi klinis berupa mual, muntah, hipotermia, kelemahan, lesu, hingga diare (Purnomo *et al.*, 2019). Efektivitas bakteriosin dalam menekan pertumbuhan mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh sejumlah faktor, terutama yang berkaitan dengan kondisi lingkungan serta karakteristik fisiologis dari bakteri penghasilnya. Faktor-faktor tersebut dapat menentukan stabilitas, aktivitas, dan jumlah 3 bakteriosin yang dihasilkan, yang pada akhirnya memengaruhi potensi antimikroba yang ditunjukkan terhadap mikroorganisme target. Faktor-faktor penting yang berperan meliputi pH, suhu, dan durasi inkubasi. pH lingkungan dapat memengaruhi konformasi struktur bakteriosin, sehingga berdampak langsung terhadap aktivitas antimikroba yang dihasilkannya. Bakteriosin umumnya menunjukkan stabilitas terhadap pemanasan, karena adanya struktur asam amino tertentu yang tahan terhadap perubahan suhu. Waktu inkubasi

yang cukup juga diperlukan, karena produksi bakteriosin sering meningkat selama fase pertumbuhan logaritmik bakteri (Maylani *et al.*, 2022). Penelitian (Sari *et al.*, 2018) menunjukkan bakteriosin menunjukkan aktivitas antimikroba yang stabil dalam berbagai kondisi lingkungan, termasuk pada rentang pH antara 2 hingga 6. Bakteriosin memiliki ketahanan yang baik terhadap perlakuan panas, dengan aktivitas antimikroba yang tetap stabil setelah pemanasan pada suhu antara 40°C hingga 100°C selama 30 menit, serta pada suhu 121°C selama 15 menit. Selain itu, lama inkubasi merupakan faktor penting dalam mengoptimalkan produksi bakteriosin. Penelitian yang dilakukan oleh (Angkuna *et al.*, 2019) mengungkapkan bahwa inkubasi selama 32 jam menghasilkan jumlah bakteriosin tertinggi, yang ditunjukkan oleh terbentuknya zona hambat terbesar dengan rata-rata diameter 13,55 mm terhadap *S. aureus* dan 10,85 mm terhadap *E. coli*. Berdasarkan penjelasan pada latar belakang, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji pengaruh variasi pH, suhu, dan lama waktu inkubasi terhadap kemampuan *Ls. rhamnosus* KBJ dalam memproduksi senyawa antibakteri yang efektif dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus*. Melalui pengujian terhadap ketiga variabel tersebut, diharapkan diperoleh kondisi optimum yang dapat mendukung aktivitas metabolik *Ls. rhamnosus* dalam memproduksi agen antibakteri. Temuan dari penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi dalam pengembangan pendekatan alternatif untuk menanggulangi resistensi antibiotik yang semakin meluas, serta menjadi dasar dalam formulasi produk kesehatan berbasis *Ls. rhamnosus* sebagai agen antibakteri alami.

BAHAN DAN METODE

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *biosafety cabinet* (BSC), timbangan analitik, autoklaf, *incubator*, *vortex*, *hot plate*, *beaker glass*, tabung reaksi, pipet tetes, batang pengaduk, aluminium foil, plastik wrap, bunsen, erlenmeyer, cawan petri, *glass* ukur, spatula, mikroskop, jarum ose, kertas label, kapas, kertas pembungkus, plastik, gunting, mikropipet dan tip, jangka sorong, *object glass*, pH meter, pinset, dan termometer.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : media dasar pertumbuhan bakteri Medium *deMan Rogosa Sharpe Broth* (MRSB) (Himedia, India), Medium *deMan Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) (Himedia, India), *Mueller-Hinton Agar* (MHA) (Himedia, India), *Nutrient Agar* (NA) (Himedia, India), *Natrium hidroksida* (NaOH), Asam klorida (HCl), *aquadest*, alkohol 70%, kristal violet, lugol, safranin, larutan *Mc. Farland* dan spirtus. Bakteri yang digunakan adalah *Ls. rhamnosus* KBJ, bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang merupakan koleksi dari Laboratorium Mikrobiologi Stikes Prima Indonesia.

Uji Variasi pH, Suhu dan Waktu Inkubasi

Siapkan 3 tabung reaksi yang telah berisi MRSB. Masing-masing tabung ditambahkan HCl dan NaOH secara berturut-turut hingga mencapai pH 5, pH 7, pH 9. Diambil 1 ose koloni *Ls. rhamnosus* KBJ berumur 48 jam dimasukkan kedalam tiap – tiap tabung reaksi yang berisi MRSB dan pH berbeda. Dilanjut dengan perlakuan variasi suhu, siapkan 3 tabung reaksi yang telah berisi MRSB diambil 1 ose koloni *Ls. rhamnosus* KBJ berumur 48 jam dimasukkan kedalam tiap – tiap tabung reaksi yang berisi MRSB diinkubasi pada suhu yang berbeda yaitu suhu 34°C, 37°C dan 40°C dalam inkubator selama 24 jam. Selanjutnya perlakuan variasi waktu inkubasi, disiapkan 3 tabung reaksi yang telah berisi MRSB, diambil 1 ose koloni *Ls. rhamnosus* KBJ berumur 48 jam dimasukkan kedalam tiap – tiap tabung reaksi yang berisi MRSB dan dilakukan inkubasi pada waktu yang berbeda selama 12 jam, 24 jam dan 36 jam dalam inkubator pada suhu 37°C (Angkuna *et al.*, 2019).

Produksi Supernatan

Sebanyak 5 mL media MRSB yang telah ditumbuhkan BAL dan yang telah dilakukan perlakuan pada variasi pH, suhu dan waktu inkubasi, suspensi tersebut kemudian dihomogenkan menggunakan alat *vortex*, lalu disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit guna memperoleh supernatan yang bebas dari sel. Proses sentrifugasi ini menghasilkan dua fase, yaitu supernatan sebagai fase cair di bagian atas dan endapan sel di bagian bawah. Supernatan yang

diperoleh selanjutnya 21 digunakan sebagai sampel untuk pengujian aktivitas antibakteri (Angkuna *et al.*, 2019).

Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

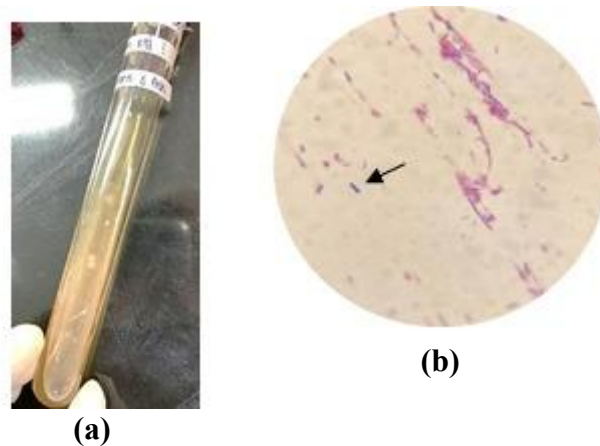
Suspensi koloni uji *E. coli* dan *S. aureus* dibuat dengan cara mengambil satu ose koloni dari media NA padat ke tabung reaksi berisi 9 mL NaCl 0,9%. Kekeruhan pada suspensi koloni uji di standarisasi dengan standar 0,5 McFarland (Nurhayati *et al.*, 2020)

Uji Aktivitas Antibakteri

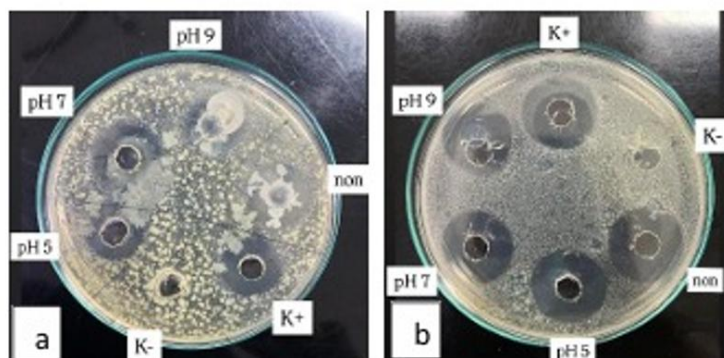
Pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen dilakukan dengan metode sumuran dan inokulum dari bakteri *E. coli* dan *S. aureus* di inokulasi pada media *Mueller Hilton Agar* (MHA) menggunakan metode tuang (*pour plate*). Enam sumuran dibuat dalam satu petri dengan menggunakan *assay silinder*. Kemudian, ditambahkan 25 μ L supernatan isolat bakteri asam laktat, MRSB murni untuk kontrol negatif, dan larutan ciprofloxacin sebagai kontrol positif, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah proses inkubasi selesai, diameter zona hambat yang terbentuk diukur dengan jangka sorong.

HASIL

Peremajaan bakteri *Ls. rhamnosus* KBJ dilakukan dengan menggunakan media MRSA metode inokulasi *streak* atau gores pada media agar miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (Gambar 1.a). Hasil peremajaan didapatkan hasil koloni memiliki ciri-ciri berbentuk halus, bulat dan berwarna putih. Hasil pengamatan mikroskopik Gambar 1.b dengan pewarnaan gram pada sampel isolat *Ls. rhamnosus* KBJ menggunakan mikroskop cahaya diperoleh hasil bakteri gram positif berwarna ungu dengan bentuk batang.



Gambar 1. Bakteri *Ls. rhamnosus* KBJ pada (a) agar miring dan (b) pengamatan dibawah mikroskop dengan pewarnaan Gram (*Ls. rhamnosus* KBJ bacteria on (a) oblique agar and (b) observation under a microscope with Gram staining).

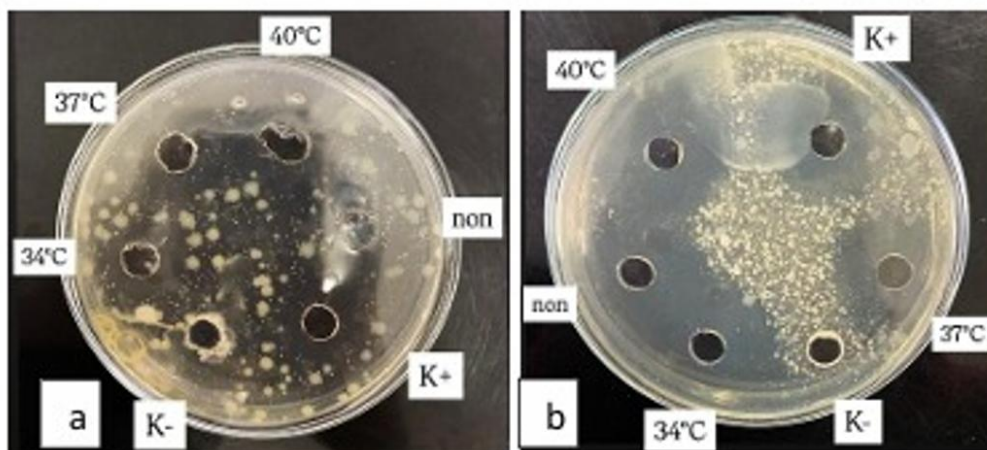


Gambar 2. Zona Hambat Variasi pH Inkubasi Supernatan Bebas Sel *Ls. rhamnosus* KBJ terhadap (a) *S. aureus* dan (b) *E. coli*. (Figure 5.7 Inhibition Zone of pH Variation of Incubation of Cell-Free Supernatant of *Ls. rhamnosus* KBJ against (a) *S. aureus* and (b) *E. coli*).

Tabel 1. Aktivitas Antibakteri Supernatan Bebas Sel *Ls. rhamnosus* KBJ Terhadap *S. aureus* dan *E. coli* Dengan Variasi pH Inkubasi Berbeda (Antibacterial Activity of Cell-Free Supernatant of *Ls. rhamnosus* KBJ Against *S. aureus* and *E. coli* With Different Variations of Incubation pH).

Sampel (Samples)	pH	Diameter Zona Hambat (Inhibition zone diameter) (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Supernatan Bebas Sel <i>Ls. rhamnosus</i> KBJ	5	12,25 mm	15,25 mm
	7	12 mm	14,75 mm
	9	10 mm	13,5 mm
Supernatan Bebas Sel <i>Ls. rhamnosus</i> KBJ Non adjusted	6.5	12,75 mm	14 mm
Kontrol Positif (Ciprofloxacin)	-	0	13,5 mm
Kontrol Negatif (MRSB Murni)	-	0	0

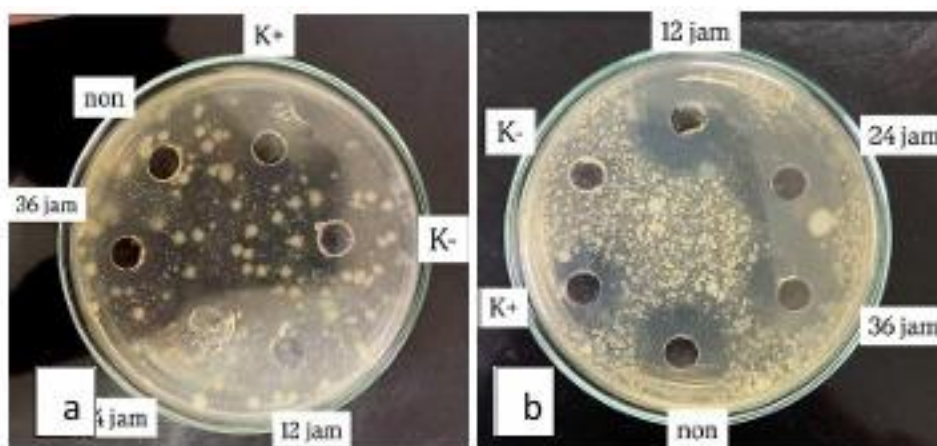
Hasil pemeriksaan diameter zona hambat ditunjukkan pada Gambar 2 dan Tabel 1 yaitu pengujian terhadap bakteri indikator *E. coli* dan *S. aureus* yaitu terbentuk zona hambat di sekeliling sumuran, pada bakteri *S. aureus* zona hambat yang dihasilkan pada pH 5 dengan nilai rata-rata yaitu sebesar 12,25. mm, pH 7 terjadi sedikit penurunan dengan nilai rata-rata zona hambat sebesar 12 mm, pH 9 terjadi penurunan lagi dengan nilai rata-rata zona hambat sebesar 10 mm. Selanjutnya bakteri *E. coli* zona hambat yang dihasilkan pada pH 5 dengan nilai rata-rata yaitu sebesar 15,25 mm, pH 7 terjadi sedikit penurunan dengan nilai rata-rata zona hambat 14,75 mm, pH 9 terjadi penurunan lagi dengan nilai rata-rata zona hambat 13,5 mm.



Gambar 3. Zona Hambat Variasi Suhu Inkubasi Supernatan Bebas Sel *Ls. rhamnosus* KBJ terhadap (a) *S. aureus* dan (b) *E. coli*. (Inhibition Zone of Variation in Incubation Temperature of Cell-Free Supernatant of *Ls. rhamnosus* KBJ against (a) *S. aureus* and (b) *E. coli*).

Tabel 2. Aktivitas Antibakteri Supernatan Bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ Terhadap *S. aureus* dan *E. coli* Dengan Variasi Suhu Inkubasi Berbeda (*Antibacterial Activity of Cell-Free Supernatant of Ls. rhamnosus* KBJ Against *S. aureus* and *E. coli* With Different Incubation Temperature Variations)

Sampel (Samples)	Suhu Inkubasi (Incubation Temperature) (°C)	Diameter Zona Hambat (Inhibition zone diameter) (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Supernatan Bebas Sel <i>Ls. rhamnosus</i> KBJ	34	10	18
	37	9	18,5
	40	11,5	22,5
Supernatan Bebas Sel <i>Ls. rhamnosus</i> KBJ Non adjusted	25	11	19
Kontrol Positif (Ciprofloxacin)	-	12	20
Kontrol Negatif (MRSB Murni)	-	0	0



Gambar 4. Zona Hambat Variasi Waktu Inkubasi Supernatan Bebas Sel *Ls. rhamnosus* KBJ terhadap (a) *S. aureus* dan (b) *E. coli*. (*Inhibition Zone Variation of Incubation Time of Cell-Free Supernatant of Lx. rhamnosus* KBJ against (a) *S. aureus* and (b) *E. coli*).

Tabel 3. Aktivitas Antibakteri Supernatan Bebas Sel *Ls. rhamnosus* KBJ Terhadap *S. aureus* dan *E. coli* Dengan Variasi Waktu Inkubasi Berbeda (*Antibacterial Activity of Cell-Free Supernatant of Ls rhamnosus* KBJ Against *S. aureus* and *E. coli* With Different Incubation Time Variations).

Sampel (Samples)	Waktu Inkubasi (Incubation Time) (jam) (Hour)	Diameter Zona Hambat (Inhibition zone diameter) (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Supernatan Bebas Sel <i>Ls. rhamnosus</i> KBJ	12	12	17,5
	24	12,5	13,5
	36	9,5	11
Supernatan Bebas Sel <i>Ls. rhamnosus</i> KBJ Non adjusted	0	12	12
Kontrol Positif (Ciprofloxacin)	-	12	9
Kontrol Negatif (MRSB Murni)	-	0	0

Hasil aktivitas antibakteri ditunjukkan pada Gambar 4 dan Tabel 3 terlihat bahwa bakteriosin *Ls. rhamnosus* KBJ menunjukkan aktivitas daya hambat terhadap bakteri *S. aureus* yaitu pada waktu inkubasi 12 jam nilai zona hambat yang dihasilkan 12 mm, pada waktu inkubasi 24 jam nilai zona hambat yang dihasilkan 12,5 mm, pada waktu inkubasi 36 jam nilai zona hambat yang dihasilkan 9,5 mm dan bakteri *E. coli* yaitu pada waktu inkubasi 12 jam nilai zona hambat yang dihasilkan 17,5 mm, pada waktu inkubasi 24 jam nilai zona hambat yang dihasilkan 13,5 mm, pada waktu inkubasi 36 jam nilai zona hambat yang dihasilkan 11 mm.

PEMBAHASAN

Proses peremajaan bakteri

Ls. rhamnosus KBJ dilakukan menggunakan media MRSA dengan metode inokulasi *streak plate* pada agar miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Hasil yang diperoleh menunjukkan koloni berbentuk halus, bulat, dan berwarna putih, sesuai dengan penelitian Aini *et al.*, 2022. Sementara itu, peremajaan *S. aureus* dilakukan pada media NA dengan metode *streak plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang terbentuk memiliki morfologi bulat cembung, tepian rata, permukaan halus dan licin, serta berwarna kekuningan, sebagaimana dilaporkan dalam penelitian Pratama *et al.*, 2025. Adapun peremajaan *E. coli* juga dilakukan pada media NA menggunakan metode *streak plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, koloni yang dihasilkan berbentuk bundar, permukaannya halus dengan tepian yang jelas, serta berwarna kekuningan, yang sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Pratama *et al.*, 2025.

Uji konfirmasi identifikasi bakteri dilakukan melalui pewarnaan gram, yang merupakan metode pewarnaan diferensial untuk mengelompokkan bakteri menjadi dua kategori utama, yaitu gram positif dan gram negatif. Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis pada Gambar 1.b, *Ls. rhamnosus* KBJ tampak sebagai bakteri gram positif dengan pewarnaan ungu dan morfologi batang, sesuai dengan penelitian Aini *et al.*, 2022. Sementara itu, hasil pengamatan mikroskopis terhadap *S. aureus* pada Gambar 1.b menunjukkan karakteristik gram positif berwarna ungu dengan bentuk *coccus*, hal ini sejalan dengan penelitian Yanto *et al.*, 2021. Menurut Yanto *et al.*, 2021 mengatakan bahwa teknik pewarnaan gram didasarkan atas perbedaan struktur diferensial dinding sel. Pewarnaan terhadap gram positif penting dilakukan mengingat keberadaan *S. aureus* memiliki struktur dinding sel yang didominasi oleh satu jenis molekul, yaitu peptidoglikan, yang menyusun sekitar 90% dari keseluruhan dinding sel dan membentuk lapisan yang sangat tebal. Selama proses dehidrasi dengan alkohol, 30 pori-pori pada dinding sel bakteri mengalami penutupan, sehingga kompleks kristal violet-iodin tetap tertahan di dalam sel. Kondisi ini menyebabkan *S. aureus*, sebagai bakteri gram positif, tetap mempertahankan warna ungu saat diamati di bawah mikroskop (Yanto *et al.*, 2021). Bakteri gram positif dikenal memiliki kemampuan untuk mempertahankan zat warna primer kristal violet, sehingga tampak berwarna ungu atau biru keunguan. Hal ini disebabkan oleh struktur dinding selnya yang memiliki lapisan peptidoglikan tebal, yang secara signifikan lebih besar dibandingkan dengan bakteri gram negatif, sehingga mampu mempertahankan zat warna tersebut meskipun telah melalui tahap pelunturan dengan alkohol (Asfiya *et al.*, 2024).

Hasil pengamatan mikroskopik yang ditunjukkan pada Gambar 1.b, *E. coli* teridentifikasi sebagai bakteri gram negatif berbentuk batang (*basil*) dan tampak berwarna merah. Perbedaan warna hasil pewarnaan Gram antara *E. coli* dan bakteri gram positif disebabkan oleh perbedaan struktur dinding sel yang memengaruhi permeabilitas terhadap zat pewarna (Oktavia & Pujiyanto, 2018). Bakteri gram negatif mengalami dekolorisasi oleh pelarut organik, seperti alkohol, sehingga kehilangan pewarna primer dan menyerap zat pewarna kontras (safranin), yang menyebabkan warnanya menjadi merah. Dinding sel bakteri gram negatif memiliki kandungan lipid yang lebih tinggi dibandingkan gram positif, serta terdiri dari tiga lapisan, dengan lapisan terluar berupa lipopolisakarida. Lapisan ini mudah larut dalam etanol, sehingga terlepas saat proses pelunturan dan memungkinkan safranin masuk ke dalam sel. Selain itu, penambahan larutan lugol menyebabkan terbentuknya kompleks antara kristal violet dan iodin, yang meningkatkan daya ikat zat warna terhadap dinding sel. Namun, etanol absolut dapat melarutkan lipid dan membentuk pori-pori pada dinding sel gram negatif, sehingga kompleks warna primer hilang dan digantikan oleh pewarna

kontras, sehingga kompleks kristal violet-iodin tetap menempel di dinding sel, sel gram negatif menjadi bening. Oleh karena itu, warna kristal violet tidak mampu menempel pada bakteri gram negatif. Hal ini juga mengakibatkan bakteri gram negatif mampu mengikat warna merah 31 safranin. Fungsi zat safranin disini adalah hanya sebagai pembeda (kontras) terhadap zat warna kristal violet (Amin *et al.*, 2023). Prosedur pewarnaan Gram diawali dengan membersihkan permukaan gelas objek menggunakan alkohol 96% untuk memastikan kesterilan. Selanjutnya, satu tetes akuades ditetaskan ke permukaan gelas objek, kemudian koloni bakteri yang tumbuh terpisah pada media diambil menggunakan jarum ose dan dihomogenkan dalam tetesan akuades tersebut. Setelah itu, dilakukan proses fiksasi untuk menempelkan preparat ke permukaan kaca objek. Pewarnaan diawali dengan pemberian kristal violet selama 1 menit, yang berfungsi sebagai pewarna primer untuk membedakan tipe bakteri berdasarkan struktur dinding selnya. Langkah berikutnya adalah penambahan larutan iodine selama 1 menit, yang bertindak sebagai antiseptik dan disinfektan, serta memperkuat ikatan kompleks kristal violet-iodine dengan asam ribonukleat dan magnesium dalam sel. Preparat kemudian dicuci dengan etanol selama 20 detik, yang berfungsi melarutkan lipid dalam dinding sel bakteri gram negatif. Sebagai tahap akhir, preparat ditetaskan safranin dan didiamkan selama 1 menit untuk memberikan pewarna tandingan pada sel yang kehilangan warna primer akibat pelunturan (Amin *et al.*, 2023). Setelah proses pewarnaan selesai, preparat dibilas menggunakan air mengalir dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah benar-benar kering, preparat ditetesi dengan minyak imersi untuk meningkatkan resolusi pengamatan, kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. Hasil pewarnaan menunjukkan bahwa bakteri gram positif akan tampak berwarna ungu, sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah. Selain pewarnaan, dilakukan pula pengamatan morfologi sel untuk mengidentifikasi bentuk bakteri, apakah berbentuk bulat (*coccus*), batang (*bacillus*), atau spiral (*spirillum*) (Aini *et al.*, 2022). Bakteriosin merupakan senyawa berprotein yang disekresikan oleh bakteri probiotik dan memiliki sifat antimikroba, sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Variasi ukuran zona hambat yang terbentuk pada masing-masing jenis bakteri berkaitan dengan perbedaan 32 efektivitas aktivitas antibakteri, yang dipengaruhi oleh karakteristik dinding sel bakteri target. Struktur dinding sel yang berbeda antara satu bakteri dengan yang lain memengaruhi tingkat sensitivitas atau resistensi terhadap senyawa antimikroba, termasuk bakteriosin. Aktivitas produksi bakteriosin oleh bakteri probiotik akan dipengaruhi faktor pH, suhu, serta waktu inkubasi yang berpengaruh pada metabolisme produksi bakteriosin (Hamidah *et al.*, 2019).

Pengaruh pH Inkubasi *Ls. rhamnosus* KBJ

Pada Aktivitas Antibakteri Supernatan Bebas Sel Terhadap *S. aureus* dan *E. coli* Hasil pengujian supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan diameter zona hambat sebesar 10 mm hingga 12,75 mm pada berbagai kondisi pH. Zona hambat tertinggi diperoleh pada pH *non adjusted* yaitu pH 6,5 (12,75 mm) dan kontrol positif (12,75 mm). Pada pH 5 (12,25 mm), pH 7 (12 mm), hasil terendah yaitu pada pH 9 sebesar 10 mm, sedangkan kontrol negatif tidak menunjukkan zona hambat. Meskipun terdapat variasi, seluruh hasil aktivitas antibakteri supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ tergolong dalam kategori lemah. Produksi metabolit primer maupun sekunder sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan pertumbuhan sel termasuk pH. Pada hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ terhadap *S. aureus* pada pH 5 lebih kecil dibandingkan dengan pH *non adjusted* yaitu pH 6,5. BAL diketahui mampu menghasilkan berbagai senyawa antimikroba, seperti asam laktat, asam asetat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin. Pada kondisi pH yang terlalu rendah, seperti pH 5, aktivitas metabolisme sel *Ls. rhamnosus* KBJ dapat mengalami penurunan akibat tekanan asam (*acid stress*), yang menyebabkan terganggunya fungsi enzimatis, stabilitas membran, dan sintesis protein. Akibatnya, produksi senyawa antimikroba menjadi tidak optimal, meskipun kondisi lingkungan bersifat asam. Sebaliknya, pada pH 6,5 yang mendekati pH netral, BAL memiliki kondisi pertumbuhan yang lebih optimal. Menurut Suphandi *et al.* (2023), banyak strain BAL menunjukkan aktivitas metabolik tertinggi pada kisaran pH 6,0 – 33 6,5, sehingga memungkinkan produksi maksimum senyawa antimikroba. Oleh karena itu, meskipun pH 6,5 kurang

asam dibandingkan pH 5, namun tingginya jumlah dan aktivitas senyawa antimikroba yang dihasilkan pada pH ini justru menghasilkan daya hambat yang lebih besar terhadap *S. aureus*. Demikian pada pH 9, suasana basa menyebabkan turunnya viabilitas BAL, sehingga zona hambat juga mengecil (Suphandi *et al.*, 2023). Supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ juga menunjukkan kemampuan menghambat *E. coli* dengan zona hambat sebesar 13,5 mm hingga 15,25 mm dengan kategori lemah. Zona hambat tertinggi pada pH 5 (15,25 mm), pH 7 (14,75 mm), pH 6,5 *non adjusted* (12,75 mm), terendah pada pH 9 dan kontrol positif 13,5 mm, sedangkan kontrol negatif tidak menunjukkan zona hambat. pH 5 menunjukkan diameter hambat terbesar terhadap *E. coli*, mengindikasikan bahwa suasana asam lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri ini. Pada kondisi asam, asam laktat yang dihasilkan oleh supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ berada dalam bentuk non dissosiasi, yang lebih mudah menembus membran sel dan menurunkan pH intraseluler bakteri target, menghambat aktivitas enzimatis, dan menyebabkan kematian sel (Ningsih *et al.*, 2018). Seiring meningkatnya pH menjadi netral dan basa yaitu pH 7 dan 9, terjadi penurunan aktivitas antibakteri. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sari *et al.* (2018) menyatakan bahwa bakteriosin memiliki aktivitas dengan pengujian pengaruh pH pada rentang pH 2 sampai 6. Bakteriosin menunjukkan aktivitas tertinggi pada kondisi asam karena stabilitas struktur protein antibakterinya terjaga. Dalam kondisi basa, struktur protein dapat mengalami denaturasi sehingga efektivitasnya menurun (Sari *et al.*, 2018). Menurut Ren *et al.* (2022), pH yang rendah mempertahankan bentuk non ionik dari asam organik seperti asam laktat dan asetat, yang merupakan senyawa utama dalam supernatan BAL. Dalam bentuk ini, asam dapat dengan mudah menembus membran sel bakteri dan menurunkan pH intraseluler, sehingga mengganggu fungsi metabolisme dan menyebabkan kematian sel 34 bakteri. Namun, ketika pH dinaikkan, asam organik akan terionisasi menjadi bentuk garam yang tidak dapat menembus membran bakteri secara efektif, sehingga mengurangi kemampuan antibakterinya. Selain itu, bakteri asam laktat juga memproduksi senyawa protein seperti bakteriosin yang memiliki aktivitas antimikroba. Stabilitas dan efektivitas bakteriosin sangat dipengaruhi oleh pH lingkungan. Pada kondisi asam, bakteriosin cenderung lebih stabil dan aktif, sedangkan pada pH netral hingga basa, aktivitasnya menurun karena denaturasi protein atau gangguan struktur fungsionalnya (Ren *et al.*, 2022). Kontrol positif (ciprofloxacin) menghasilkan diameter hambat yang sama besar dengan supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ pada pH 6,5 *non adjusted* yaitu 12,75 mm. Hal ini dapat disebabkan oleh konsentrasi antibiotik yang digunakan relatif rendah, apabila konsentrasi antibiotik yang digunakan terlalu rendah, maka efektivitas daya hambat yang dihasilkan cenderung lebih kecil dibandingkan dengan senyawa antibakteri alami yang dihasilkan oleh supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ, terutama jika senyawa tersebut hadir dalam jumlah yang lebih tinggi atau menunjukkan aktivitas yang lebih efektif dalam kondisi lingkungan tertentu. Selain itu, efisiensi penetrasi antibiotik ke dalam media juga dapat memengaruhi pembentukan zona hambat selama pengujian aktivitas antibakteri. Oleh karena itu, diperlukan teknik pembuatan sumuran yang tepat dan presisi agar tidak mengganggu validitas uji sensitivitas antibiotik terhadap bakteri uji (Khusuma *et al.*, 2019).

Pengaruh Suhu Inkubasi *Ls. rhamnosus* KBJ Pada Aktivitas Antibakteri Supernatan Bebas Sel Terhadap *S. aureus* dan *E. coli*

Pada perlakuan suhu hasil menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ terhadap *S. aureus* pada berbagai suhu inkubasi berada dalam kategori daya hambat lemah dengan diameter zona hambat sebesar 9 mm hingga 11,5 mm. Aktivitas antibakteri supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ tertinggi diperoleh dari hasil inkubasi sel *Ls. rhamnosus* KBJ pada suhu 40°C (11,5 mm), *non adjusted* suhu 25°C (11 mm), suhu 34°C 35 (10 mm), terendah pada suhu 37°C (9 mm), kontrol positif (12 mm), sedangkan kontrol negatif tidak menunjukkan zona hambat. Perbedaan diameter zona hambat ini mencerminkan pengaruh suhu terhadap aktivitas metabolisme sel *Ls. rhamnosus* KBJ dalam menghasilkan metabolit primer dan sekunder. Secara umum, suhu inkubasi dapat memengaruhi laju pertumbuhan BAL, sintesis enzim, dan stabilitas senyawa aktif (Wang *et al.*, 2021). Suhu 25°C *non adjusted* menghasilkan diameter zona hambat yang lebih besar dibandingkan suhu 34°C dan 37°C, yang umumnya dianggap mendekati suhu optimal bagi

pertumbuhan BAL. Hal ini menunjukkan bahwa suhu 25°C merupakan kondisi inkubasi yang paling optimum bagi aktivitas metabolisme sel *Ls. rhamnosus* KBJ dalam memproduksi metabolit primer maupun sekunder, seperti hidrogen peroksida atau biosurfaktan, yang bisa lebih stabil pada suhu lebih rendah (Trianes *et al.*, 2022). Selain itu, pada suhu 34°C dan 37°C, meskipun mendekati suhu pertumbuhan optimal BAL, aktivitas enzimatis BAL bisa terganggu oleh stres termal ringan atau adanya kompetisi metabolit, sehingga produksi senyawa antimikroba menurun, menyebabkan diameter zona hambat juga mengecil. Namun, pada suhu 40°C, terjadi peningkatan kembali diameter zona hambat nya beberapa strain BAL mampu beradaptasi pada suhu tinggi dan tetap aktif menghasilkan senyawa antimikroba, terutama jika paparan suhu tersebut tidak terlalu ekstrem atau berlangsung dalam waktu yang singkat. Dengan demikian, variasi aktivitas antibakteri supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ terhadap *S. aureus* pada berbagai suhu tidak hanya ditentukan oleh pertumbuhan BAL itu sendiri, tetapi juga oleh stabilitas dan efektivitas senyawa antimikroba yang dihasilkan, serta tingkat sensitivitas bakteri target terhadap senyawa tersebut dalam kondisi lingkungan tertentu. Berbeda dengan *S. aureus*, aktivitas antibakteri supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ menunjukkan daya hambat lebih besar terhadap *E. coli* dengan peningkatan zona hambat secara signifikan seiring peningkatan suhu inkubasi. Aktivitas antibakteri tertinggi dari supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ dicapai pada suhu inkubasi 40°C, dengan diameter zona hambat sebesar 22,5 mm yang dikategorikan sebagai aktivitas sedang. Sementara itu, pada suhu 34°C (18 mm), 37°C (18,5 mm), suhu *non adjusted* 25°C (19 mm), serta kontrol positif (20 mm), zona hambat yang dihasilkan termasuk dalam kategori aktivitas lemah. Temuan ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Sari *et al.* (2018), yang melaporkan bahwa bakteriosin tetap menunjukkan aktivitas antibakteri setelah pemanasan dalam rentang suhu 40°C hingga 121°C. Menurut Ibrahim *et al.* (2021), Hidrogen peroksida (H₂O₂) merupakan agen antimikroba yang sangat efektif, terutama bila digunakan secara sinergis dengan perlakuan panas, karena kombinasi tersebut dapat meningkatkan aktivitas antimikroba secara signifikan. Di sisi lain, bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri asam laktat (BAL) umumnya bersifat termostabil, disebabkan oleh struktur sekundernya yang stabil serta berat molekulnya yang relatif rendah. Peningkatan suhu diketahui dapat memperkuat aktivitas antibakteri BAL terhadap *E. coli*, yang kemungkinan disebabkan oleh meningkatnya produksi asam organik dan senyawa antimikroba sekunder pada suhu tinggi. Salah satu metabolit utama yang dihasilkan oleh BAL, yaitu asam laktat, diketahui efektif melawan bakteri gram negatif seperti *E. coli* dengan cara merusak membran luar sel dan mengganggu gradien proton, yang penting bagi kelangsungan hidup sel bakteri tersebut (Suphandi *et al.*, 2023).

Pengaruh Waktu Inkubasi *Ls. rhamnosus* KBJ Pada Aktivitas Antibakteri Supernatan Bebas Sel Terhadap *S. aureus* dan *E. coli*

Pada perlakuan waktu inkubasi *Ls. rhamnosus* KBJ memengaruhi aktivitas antibakteri supernatan bebas sel terhadap *S. aureus* dan *E. coli*, meskipun seluruh hasil uji berada dalam kategori lemah. Pada *S. aureus*, aktivitas antibakteri terbesar pada waktu inkubasi 24 jam (12,5 mm), 12 jam (12 mm), 36 jam (9,5 mm), *non adjusted* (12 mm), kontrol positif (12 mm). Sedangkan pada *E. coli*, aktivitas antibakteri supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ terbesar pada 12 jam (17,5 mm), kemudian menurun pada 24 jam (13,5 mm) dan 36 jam (11 mm) dan kontrol positif (9 mm). Peningkatan zona hambat pada jam ke-12 hingga 24 menunjukkan bahwa *Ls. rhamnosus* KBJ aktif memproduksi metabolit primer maupun sekunder seperti asam laktat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin. Namun, pada inkubasi 36 jam, *Ls. rhamnosus* KBJ telah memasuki fase *stasioner* dan menyebabkan penurunan produksi metabolit, bahkan mengalami degradasi karena kondisi nutrisi yang semakin menipis dan akumulasi senyawa toksik yang dihasilkan. Aktivitas antimikroba supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ sangat bergantung pada fase pertumbuhan bakteri *Ls. rhamnosus* KBJ dimana produksi metabolit primer maupun sekunder optimum pada fase *log* hingga awal fase *stasioner* yang ditandai dengan aktivitas antibakteri yang tinggi pada supernatan bebas sel. Perbedaan aktivitas antibakteri yang dihasilkan pada kedua bakteri tersebut disebabkan oleh perbedaan sensitivitas membran sel antara bakteri gram negatif (*E. coli*) dan gram positif (*S. aureus*), serta perbedaan mekanisme kerja senyawa antimikroba BAL terhadap masing-masing tipe dinding

sel bakteri. Aktivitas antibakteri pada perlakuan *non adjusted* serupa terhadap *S. aureus* dan *E. coli*, yang menunjukkan bahwa waktu inkubasi dan kondisi lingkungan sangat memengaruhi konsistensi hasil uji. Sementara itu, kontrol negatif tidak menunjukkan zona hambat sama sekali, membuktikan bahwa daya hambat memang berasal dari senyawa yang dihasilkan oleh supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ. Waktu inkubasi yang optimal ditandai dengan periode ketika produksi bakteriosin sebagai agen antimikroba mencapai tingkat tertinggi, yang secara visual ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening terbesar di sekitar sumur pada media uji. Berdasarkan pengamatan, aktivitas optimum *Ls. rhamnosus* KBJ terhadap *S. aureus* terjadi pada inkubasi selama 24 jam, sedangkan terhadap *E. coli* pada 12 jam. Penurunan aktivitas bakteriosin pada waktu inkubasi yang lebih lama diduga disebabkan oleh terbentuknya enzim protease atau senyawa inaktivator lainnya yang dapat merusak struktur bakteriosin. Bakteriosin sendiri merupakan protein antimikroba yang disintesis oleh bakteri 38 asam laktat, yang umumnya mulai diproduksi pada akhir fase pertumbuhan eksponensial (*log*) dan mencapai konsentrasi maksimum pada awal fase stasioner, yaitu sekitar 12 hingga 24 jam masa inkubasi. Pada fase *log*, bakteri mengalami pembelahan sel secara aktif dengan laju pertumbuhan eksponensial, di mana setiap sel membelah menjadi dua, sehingga jumlah populasi meningkat dua kali lipat pada setiap generasi. Pada fase stasioner, pertumbuhan sel bakteri mencapai keseimbangan, di mana jumlah sel yang baru tumbuh setara dengan jumlah sel yang mati. Kondisi ini terjadi karena ketersediaan nutrisi mulai menurun. Pada fase ini, bakteri asam laktat (BAL) cenderung memproduksi metabolit sekunder sebagai mekanisme pertahanan terhadap tekanan lingkungan maupun kompetitor mikroba lainnya. Produksi bakteriosin dalam fase ini sangat dipengaruhi oleh durasi inkubasi, yang berkaitan erat dengan faktor-faktor kritis seperti ketersediaan nutrisi, nilai pH media, dan suhu, yang secara keseluruhan menentukan kemampuan BAL dalam menghasilkan senyawa antibakteri tersebut. Seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi, ketersediaan nutrisi dalam media akan menurun, sementara akumulasi asam-asam organik akibat aktivitas metabolisme bakteri menyebabkan penurunan pH menjadi semakin asam. Kondisi ini dapat menghambat aktivitas bakteriosin, karena lingkungan yang terlalu asam dan miskin nutrisi cenderung tidak mendukung stabilitas maupun efektivitas senyawa antimikroba tersebut (Angkuna *et al.*, 2019). Waktu optimal dalam siklus pertumbuhan untuk menghasilkan bakteriosin sangat bergantung pada karakteristik spesifik dari masing-masing jenis bakteri. Bakteriosin dapat berada dalam bentuk terikat pada permukaan sel atau masih berada di dalam sel, sehingga diperlukan kondisi lingkungan tertentu yang mendukung proses pelepasan bakteriosin ke luar sel. Kondisi tersebut penting untuk memastikan produksi bakteriosin berlangsung secara maksimal dan dapat menunjukkan aktivitas antimikroba secara optimal. Hasil penelitian sesuai dengan penelitian Angkuna *et al.*, 2019 yang menyatakan bahwa fase *log* sampai stasioner terjadi pada 0-32 jam. Penurunan daya hambat pada waktu 39 inkubasi 36 jam pada kedua bakteri uji menunjukkan bahwa efektivitas senyawa antimikroba BAL menurun seiring waktu (Angkuna *et al.*, 2019). Supernatan bebas sel dari *Ls. rhamnosus* KBJ menunjukkan kemampuan berbeda dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus*. Aktivitas antibakteri ini ditunjukkan oleh terbentuknya zona hambat di sekitar sumuran pada media uji. Berdasarkan hasil penelitian, seluruh perlakuan, termasuk kontrol positif, menunjukkan efektivitas dalam menghambat pertumbuhan kedua jenis bakteri tersebut. Uji daya hambat *Ls. rhamnosus* KBJ mengindikasikan bahwa strain ini memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen gram positif maupun gram negatif. Efek penghambatan ini diduga berasal dari senyawa antimikroba yang diproduksi oleh *Ls. rhamnosus* KBJ, seperti asam laktat, diasetil, dan hidrogen peroksida (Komara *et al.*, 2022). Daya hambat antibakteri *Ls. rhamnosus* KBJ terhadap kedua bakteri lebih efektif terhadap *E. coli* (gram negatif) dibandingkan *S. aureus* (gram positif), meski keduanya tergolong memiliki zona hambat yang lemah. Supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ dalam penelitian ini cenderung lebih efektif terhadap bakteri gram negatif daripada gram positif. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan sensitivitas dinding sel bakteri terhadap senyawa metabolit yang dihasilkan supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ. Selubung sel bakteri merupakan struktur berlapis-lapis yang kompleks yang berfungsi untuk melindungi organisme ini dari lingkungan yang tidak terduga dan sering kali tidak bersahabat. Selubung sel sebagian besar bakteri terbagi menjadi dua kelompok utama. Bakteri gram negatif memiliki struktur dinding sel yang terdiri

dari lapisan peptidoglikan tipis yang terletak di antara membran dalam dan membran luar. Membran luar ini mengandung lipopolisakarida (LPS), yang berfungsi sebagai penghalang permeabilitas terhadap berbagai senyawa antimikroba, sehingga menjadikan bakteri gram negatif lebih resisten terhadap banyak agen antimikroba. Sebaliknya, bakteri gram positif tidak memiliki membran luar, sehingga dinding selnya lebih mudah ditembus oleh senyawa seperti antibiotik atau metabolit antimikroba. Namun, dinding sel gram positif tersusun atas lapisan peptidoglikan yang jauh lebih tebal dibandingkan dengan bakteri gram negatif, yang juga berperan dalam kekuatan struktural dan perlindungan terhadap tekanan osmotik (Hamidah *et al.*, 2019). Penggunaan antibiotik ciprofloxacin sebagai kontrol positif dalam penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efektivitas antibakteri antara senyawa antibiotik sintetis dengan supernatan bebas sel dari *Ls. rhamnosus* KBJ. Ciprofloxacin merupakan antibiotik yang bekerja dengan cara menghambat aktivitas enzim DNA *gyrase*, sehingga mengganggu replikasi DNA bakteri dan menyebabkan kematian sel. Secara umum, antibiotik merupakan senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme tertentu terutama jamur yang memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroba lain. Dalam konteks ini, kontrol positif berfungsi sebagai standar untuk mengevaluasi sejauh mana potensi antibakteri dari senyawa alami yang dihasilkan oleh *Ls. rhamnosus* KBJ dibandingkan dengan agen antibakteri yang sudah umum digunakan dalam pengobatan. Antibiotik sendiri merupakan agen terapeutik yang dirancang untuk mengobati serta mencegah infeksi bakteri. Obat ini bekerja melalui dua mekanisme utama, yaitu membunuh langsung bakteri (bakterisidal) atau menghambat perkembangbiakan bakteri (bakteriostatik). Ciprofloxacin merupakan antibiotik spektrum luas dari golongan *fluoroquinolone* yang secara klinis dipakai dalam pengobatan berbagai infeksi bakteri yang diakibatkan oleh kuman gram positif ataupun gram negatif. Ciprofloxacin bekerja secara bakterisid melalui mekanisme pengikatan terhadap enzim DNA *gyrase*, yakni enzim esensial yang berperan dalam relaksasi DNA superkoil selama proses replikasi. Dengan menghambat aktivitas DNA *gyrase*, ciprofloxacin secara efektif mencegah pembelahan sel bakteri. Sebagai antibiotik bakterisida, ciprofloxacin merupakan antibiotik golongan *fluorokuinolon* yang bekerja dengan menghambat proses replikasi DNA bakteri melalui penghambatan enzim *topoisomerase* II (DNA *gyrase*) dan *topoisomerase* IV, yang keduanya berperan penting dalam proses penggandaan dan perbaikan DNA. Dibandingkan dengan anggota *fluoroquinolone* lainnya, ciprofloxacin memiliki aktivitas paling kuat terhadap bakteri gram negatif berbentuk batang (basil), khususnya dari famili *Enterobacteriaceae*, seperti *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., dan *Neisseria* spp. Selain itu, ciprofloxacin juga menunjukkan efektivitas terhadap beberapa jenis bakteri gram positif (Amin *et al.*, 2025).

KESIMPULAN

pH optimum untuk aktivitas antibakteri tertinggi adalah pH 5, baik terhadap *S. aureus* maupun *E. coli*. Suhu optimum untuk aktivitas antibakteri tertinggi adalah 40°C. Waktu inkubasi terbaik untuk produksi antibakteri yaitu pada *S. aureus* adalah 24 jam dan *E. coli* 12 jam. Aktivitas antibakteri supernatan bebas sel *Ls. rhamnosus* KBJ terhadap kedua bakteri lebih efektif terhadap *E. coli* (gram negatif) dibanding *S. aureus* (gram positif).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah memberikan dukungan dalam pelaksanaan penelitian ini. Ucapan terima kasih secara khusus disampaikan kepada Program Bantuan Publikasi pada Jurnal Bereputasi Tahun 2025 yang telah memberikan dukungan dalam proses publikasi artikel ilmiah ini. Selain itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Mikrobiologi STIKes Prima Indonesia atas fasilitas dan bantuan teknis selama penelitian berlangsung.

KONTRIBUSI PENULIS

SMY dan APL berperan sebagai peneliti utama yang bertanggung jawab dalam perancangan penelitian, pelaksanaan penelitian, pengumpulan data, analisis data, serta penyusunan naskah. IM dan AT berkontribusi sebagai peneliti pendamping dalam proses pelaksanaan penelitian, pengawasan kegiatan laboratorium, serta validasi hasil penelitian. MFM berkontribusi dalam penyempurnaan, penelaahan, dan revisi naskah ilmiah. Seluruh penulis telah membaca dan menyetujui versi akhir manuskrip.

REFERENSI

- Aini, A., Ustiawaty, J., Kurniawan, E., Maulana, A. 2022. Isolate and Characterization of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Local Nira as Probiotic Starter Candidates. *Jurnal Biologi Tropis*, 22(4), pp.1195–1203. <https://doi.org/10.29303/jbt.v22i4.4429>
- Amin, S. S., Ghozali, T. Z., Efendi, M. R. S. 2023. Identifikasi Bakteri dari Telapak Tangan dengan Pewarnaan Gram. *Chemviro: Jurnal Kimia Dan Ilmu Lingkungan*, 1(1), pp.30–35. <https://doi.org/10.56071/chemviro.v1i1.563>
- Amin, S., Nisa, F. K., Setiawati, Y., Akbar, M., Fauzan, A. 2025. Kajian Kimia Medisinal Ciprofloxacin: Mekanisme Kerja, Antibakteri, dan Pola Resistensi Bakteri, *Klinik: Jurnal Ilmiah Kedokteran dan Kesehatan* 4(2), pp.121–131.
- Angkuna, S.A., Apridamayanti, P., Sari, R. 2019. Penentuan waktu optimum produksi bakteriosin dari *Lactobacillus casei* terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Farmasi Kalbar*, 4(1), pp.1–18.
- Asfiya, N. A., Novalina, D., Astuti, T. D. 2024. Potensi Dan Uji Stabilitas Ekstrak *Lawsonia Inermis* Sebagai Cat Penutup Pada Gram Staining Dengan Variasi Suhu Potency and Stability Test of *Lawsonia inermis* Extract as Counterstain on Gram Staining with Temperature Variation. *Borneo Journal of Medical Laboratory Technology*, 6(2), pp.540–546.
- Aziz, M. A. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli* ATCC 11229 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 Secara *In Vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran, UMS: Surakarta.
- Hamidah, M. N., Rianingsih, L., Romadhon, R. 2019. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat dari Peda dengan Jenis Ikan Berbeda terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*, 1(2), pp.11–21. <https://doi.org/10.14710/jitpi.2019.6742>
- Ibrahim, S. A., Ayivi, R. D., Zimmerman, T., Siddiqui, S. A., Altemimi, A. B., Fidan, H., Esatbeyoglu, T., Bakhshayesh, R. V. 2021. Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention. *Foods*, 10(12), p.3131. <https://doi.org/10.3390/foods10123131>
- Institute for Health Metrics and Evaluation. 2022. Global Bacterial Antimicrobial Resistance Burden Estimates 2019. Institute for Health Metrics and Evaluation. <https://www.healthdata.org/research-analysis/health-risks-issues/antimicrobial-resistance-amr-research-library>
- Khusuma, A., Safitri, Y., Yuniarni, A., Rizki, K. 2019. Uji Teknik Difusi Menggunakan Kertas Saring Media Tampung Antibiotik dengan *Escherichia coli* Sebagai Bakteri Uji. *Jurnal Kesehatan Prima*, 13(2), p.151. <https://doi.org/10.32807/jkp.v13i2.257>
- Komara, D., Turnip, M., Kurniatuhadi, R. 2022. Potensi Uji Daya Hambat Bakteri Asam Laktat Isolat *Lactobacillus* sp. (KG61) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Agroprimatech*, 6(1), 25–31. <https://doi.org/10.34012/agroprimatech.v6i1.2990>
- Maylani, F., Kusharyati, D. F., Ryandini, D. 202). Karakterisasi dan Optimasi Aktivitas Bakteriosin Isolat Bakteri Asam Laktat LG-90 Asal Sedimen Mangrove Pantai Logending. *Jurnal Ilmiah Biologi Unsoed*, 4(1), pp.53–60. <http://repository.unsoed.ac.id/id/eprint/11210>
- Ningsih, A. S., Ekowati, C. N., Sumardi, Farisi, S. 2018. Uji Daya Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat dari Kefir terhadap *Bacillus* sp. dan *Escherichia coli*. *Biosfer: Jurnal Tadris Biologi*, 9(2), pp.217–223. <https://doi.org/10.24042/biosfer.v9i2.2608>

- Nurhayati, L. S., Yahdiyani, N., Hidayatulloh, A. 2020. Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt dengan Metode Difusi Sumuran dan Metode Difusi Cakram. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 1(2), pp.41–46. <https://doi.org/10.24198/jthp.v1i2.27537>
- Oktavia, N., Pujiyanto, S. 2018. Isolasi dan Uji Antagonisme Bakteri Endofit Tapak Dara (*Catharanthus roseus*, L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Berkala Bioteknologi*, 1(1), pp.6–12.
- Peng, H., Zhou, G., Yang, X. M., Chen, G. J., Chen, H. Bin, Liao, Z. L., Zhong, Q. P., Wang, L., Fang, X., Wang, J. 2022. Transcriptomic Analysis Revealed Antimicrobial Mechanisms of *Lactobacillus rhamnosus* SCB0119 against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), p.15159.
- Pratama, H. P. A., Syah, P. I., Royhan, I., Maritsa, H. U., Yusuf, A. I. 2025. The Activity of Pineapple Peel Eco-enzyme (*Ananas comosus* (L.) Merr) Tangkit Variety as a Natural Antiseptic Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biospecies*, 18(1), pp.7–15. <https://doi.org/10.22437/biospecies.v18i1.36701>
- Purnomo, D., Apridamayanti, P., Sari, R. 2019. Uji Aktivitas Antibakteri Minuman Yoghurt dengan Starter *Lactobacillus casei* terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1), pp.1-9.
- Ren, S., Yuan, X., Liu, F., Fang, F., Iqbal, H. M. N., Zahran, S. A., Bilal, M. 2022. Bacteriocin from *Lactocaseibacillus rhamnosus* sp. A5: Isolation, Purification, Characterization, and Antibacterial Evaluation for Sustainable Food Processing. *Sustainability* (Switzerland), 14(15), p. 9571.
- Sari, R., Apridamayanti, P., Octaviani, M. 2018. Optimasi Aktivitas Bakteriosin yang Dihasilkan oleh Bakteri *Lactobacillus plantarum* dari Minuman Ce Hun Tiau. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(1), pp.1–6. <https://doi.org/10.7454/psr.v5i1.3842>
- Suphandi, M., Sugata, M., Tan, T. J. 2023. Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Susu Sapi di Indonesia. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 8(2), pp.1–9. <https://doi.org/10.24002/biota.v8i2.6554>
- Syafitri, D., Mulyana, Yerlina. 2024. Analisis Penggunaan Antibiotik Pada Pasien Rawat Inap Bedah Di Rsud Raja Ahmad Tabib. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*, 13(1), pp.65–72. <https://doi.org/10.51887/jpfi.v13i1.1897>
- Trianes, J., Bastian, B., Hartati, D. 2022. Differences in Diameter of the Growth Inhibition Zone of *Klebsiella pneumonia* Bacteria After Incubation at 37°C and 25°C. *Indonesian Journal of Medical Laboratory Science and Technology*, 4(2), pp.120–127.
- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., Drider, D. 2019. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*, 10(February), pp.1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., Geng, W. 2021. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(May), pp.1–19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Yanto, R. B., Satriawan, N. E., Suryani, A. 2021. Identifikasi dan Uji Resistensi *Staphylococcus aureus* Terhadap Antibiotik (Chloramphenicol dan Cefptaxime Sodium) dari Pus Infeksi Piogenik di Puskesmas Proppo. *Jurnal Kimia Riset*, 6(2), pp.154-162. <https://doi.org/10.20473/jkr.v6i2.30694>