

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Mikroorganisme Endofit**

Mikroorganisme endofit merupakan salah satu organisme penghasil senyawa bioaktif. Endofit berasal dari bahasa Yunani, “endo” berarti di dalam dan “fit” (phyte) berarti tumbuhan. Mikroorganisme endofit dapat hidup bersimbiosis dengan tanaman inangnya dan dapat menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki bioaktivitas seperti zat antibakteri, antifungi dan antikanker. Menurut Tan dan Zou (2001) mikroba endofit memang dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang karakternya mirip atau sama dengan inangnya.

Menurut Strobel (2002) model interaksi mikroba endofit dengan tanaman inangnya antara lain:

1. Tanaman inang menyediakan nutrisi bagi mikroba endofit yang ada di dalamnya.
2. Tanaman inang menyediakan substrat dan zat yang penting bagi mikroba endofit untuk menyelesaikan siklus hidupnya, untuk tumbuh serta untuk pertahanan diri.
3. Mikroba endofit khususnya jamur berperan melalui proses biodegradasi tanaman inangnya setelah tanaman inang mati. Proses biodegradasi ini memiliki peran sentral di dalam siklus nutrisi.
4. Ditinjau dari kajian biologi molekuler, interaksi antara mikroba dan tanaman inangnya melibatkan transfer materi genetik. Hal tersebut berdasarkan fakta bahwa zat-zat bioaktif langka yang dihasilkan oleh tanaman tertentu dihasilkan pula oleh mikroba-mikroba endofit yang hidup di dalamnya.

Hampir semua tanaman vaskular memiliki mikroorganisme endofit. Bakteri endofit merupakan bakteri yang hidup pada jaringan tanaman tanpa merusak jaringan tanaman tersebut. Bakteri endofit dapat diisolasi dari permukaan jaringan tanaman yang steril atau diekstraksi dari jaringan tanaman bagian dalam. Bakteri

endofit Gram positif dan Gram negatif telah banyak diisolasi dari beberapa jaringan tanaman. Bakteri endofit masuk ke dalam jaringan tanaman terutama melalui akar dan bagian tanaman lain yang terpapar udara luar seperti bunga, batang dan kotiledon dapat juga dilalui. Secara khusus, bakteri masuk ke jaringan yang berkecambah, akar, stomata maupun jaringan yang rusak (Mano *et al.* 2007; Zinniel *et al.* 2002).

Penelitian Widowati *et al.* (2016) menyatakan bahwa isolat fungi endofit umbi talas mampu memproduksi hormon Indol Asam Asetat (IAA). Hormon IAA merupakan hormon auksin yang dihasilkan oleh mikroorganisme endofit dan akan diserap oleh tanaman sehingga tanaman akan tumbuh lebih cepat atau lebih besar. Terjadi simbiosis mutualisme antara mikroorganisme endofit dengan umbi talas, dimana umbi talas merupakan sumber makanan bagi mikroorganisme endofit dalam melengkapi siklus hidupnya begitupula sebaliknya dengan hormon IAA yang dihasilkan oleh mikroorganisme endofit berperan dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman atau pembesaran sel.

Beberapa mikroorganisme endofit dari tanaman tertentu diketahui mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder dan potensinya sebagai senyawa antibakteri, contohnya antara lain yaitu: isolat bakteri endofit dari kulit batang tanaman terap (*Artocarpus elasticus*) sebagai antibakteri terhadap *S. aureus* (Guplin *et al.* 2017), isolat bakteri endofit dari akar tanaman purwoceng (*Pimpinella pruatjan*) sebagai antibakteri terhadap *S. aureus* (Wilson *et al.* 2017), isolat bakteri endofit dari kulit batang tanaman srikaya (*Annona squamosa*) sebagai antibakteri terhadap *S. aureus*, *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus* (Zulkifli *et al.* 2018). Terjadi interaksi antara mikroba dan tanaman inangnya yang melibatkan transfer materi genetik bahwa zat-zat bioaktif senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh tanaman tertentu dihasilkan pula oleh mikroba-mikroba endofit yang hidup di dalam nya.

Penelitian Zulkifli (2018) menyatakan hasil karakterisasi bakteri endofit dari kulit batang tanaman srikaya yaitu pada kelompok genus *Bacillus*. Menurut

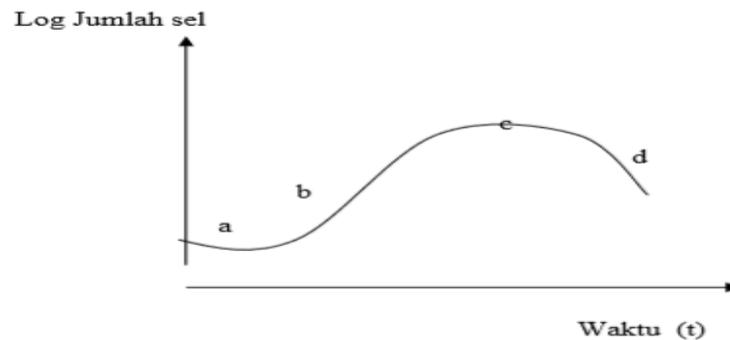
Strobel *et al.* (2004) bakteri endofit dari genus *Pseudomonas*, *Burkholderia* dan *Bacillus* memproduksi metabolit sekunder seperti Taxol sebagai antibiotik dan anticancer, asam Cytonic B sebagai antivirus, Oocydin sebagai insektisidal dan beberapa immunosupresor. Banyaknya *Bacillus* yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen kemungkinan karena *Bacillus* menghasilkan enterotoksin, *Bacillus* membentuk spora sehingga *Bacillus* mampu bertahan hidup ditempat dengan kondisi yang buruk sekalipun. *Bacillus* tersebar luas di alam dan mengkontaminasi setiap komunitas pertanian. *Bacillus* dapat diisolasi dari tanah, debu, cereal, tanaman, rambut hewan dan air tawar (Jenson dan Moir 2003).

Isolasi mikroba endofit biasanya dilakukan menurut Tomita (2003) yaitu sampel tanaman dibersihkan dari kotoran dengan cara mencucinya dengan air mengalir. Kemudian tanaman dipotong-potong dan disterilisasi permukaan menggunakan larutan etanol 75% selama 1 menit, natrium hipoklorit 5,3% selama 5 menit dan terakhir dengan etanol kembali selama 30 detik.

## **B. Pertumbuhan Mikroorganisme**

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai penambahan jumlah atau volume serta ukuran sel. Pada organisme prokariot seperti bakteri, pertumbuhan merupakan penambahan volume dan ukuran sel dan juga sebagai penambahan jumlah sel. Pertumbuhan sel bakteri biasanya mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva pertumbuhan sigmoid (Brock dan Madigan 1991)

Pertumbuhan mikroorganisme terbagi menjadi 4 macam fase yaitu fase lag, log (exponensial), stasioner dan kematian (Brock dan Madigan 1991). Dwipayana dan Ariesyady (2010) mengungkapkan bahwa salah satu pengukuran pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer dengan mengukur nilai OD pada panjang gelombang 600 nm.



**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan bakteri, menunjukkan empat fase pertumbuhan: a= fase lag; b=fase log/eksponensial; c=fase stasioner dan d=fase kematian populasi (Brock dan Madigan 1991).

Fase lag adalah periode penyesuaian bakteri terhadap lingkungan, biasanya ditandai dengan tidak adanya penambahan jumlah sel atau massa sel dan lama waktu fase ini dapat berlangsung cepat dalam hitungan menit hingga jam tergantung macam bakteri, umur biakan dan nutrisi yang terdapat pada media.

Fase log/pertumbuhan eksponensial adalah selama fase ini, masa dan volume sel meningkat oleh faktor yang sama dalam arti rata-rata komposisi sel dan konsentrasi relatif metabolit tetap konstan. Selama periode ini pertumbuhan seimbang, kecepatan peningkatan dapat diekspresikan dengan fungsi eksponensial alami. Sel membelah dengan kecepatan konstan yang ditentukan oleh sifat intrinsik bakteri dan kondisi lingkungan. Dalam hal ini terdapat keragaman kecepatan pertumbuhan berbagai mikroorganisme.

Fase stasioner adalah jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Ukuran sel pada fase ini menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat-zat nutrisi sudah habis, karena kekurangan zat nutrisi, sel kemungkinan mempunyai komposisi yang berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase logaritmik. Pada fase ini sel-sel lebih tahan terhadap keadaan ekstrim seperti panas, dingin, radiasi dan bahan-bahan kimia.

Fase penurunan populasi atau fase kematian adalah pertumbuhan sel mulai terhenti dan bakteri telah menghabiskan energi cadangan (ATP) untuk respirasinya, sehingga sel bakteri banyak yang mati (Brock dan Madigan 1991).

Penelitian Elita *et al.* (2013) menyatakan bahwa kultur umur 72 jam (hari ke-3) merupakan fase stasioner dan waktu optimum produksi senyawa antibakteri dari bakteri endofit *Pseudomonas* terhadap bakteri patogen *E. coli* dan *S. aureus*. Begitupula dengan penelitian El-Shestawy *et al.* (2015) dan Jaysree *et al.* (2011) menunjukkan bahwa fase stasioner dari kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus* yaitu pada kisaran kultur umur 72-78 jam.

### C. Tanaman Talas (*Colocasia esculenta L.*)

#### 1. Klasifikasi Tanaman

Adapun klasifikasi tanaman talas (Amiruddin 2013) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledoneae
Famili	: Araceae
Ordo	: Alismatales
Genus	: <i>Colocasia</i>
Spesies	: <i>Colocasia esculenta L.</i>

#### 2. Nama Tanaman

Tanaman talas mempunyai beberapa sinonim atau nama lain diantaranya adalah Tale (Batak), Kuladi (Minang), Talos (Lampung), Bolang (Sunda), Tales (Jawa), Paco (Sulawesi Selatan), Inane (Maluku), Warimu (Papua). Sementara talas dalam Bahasa Inggris disebut Taro, Old cocoyam, Dasheen dan Eddoe (Heyne 1987).

#### 3. Morfologi Tanaman

Talas (*Colocasia esculenta L.*) merupakan tanaman yang akarnya beronggol dari keluarga Araceae. Tanaman talas termasuk tumbuhan tegak yang memiliki perakaran liar, berserabut dan dangkal. Talas merupakan tanaman monokotil setinggi 90-180 cm. Batang yang tersimpan dalam tanah pejal, bentuk

silinder (bulat), umumnya berwarna cokelat tua, dilengkapi dengan kuncup ketiak yang terdapat di atas, lampang daun tempat munculnya umbi baru, tunas (stolon). Daun talas berbentuk perisai besar dengan tangkai panjang dan besar, lembaran daunnya berukuran 20-50 cm, dengan tangkai mencapai 1 meter panjangnya dan warna pelepahnya bermacam-macam. Permukaan daunnya ditumbuhi rambut-rambut halus yang menjadikannya kedap air (Matthews 2004).

Daun berbentuk hati dengan ujung pelepah daunnya tertancap agak ketengah helai daun sebelah bawah. Bunga terdiri atas tangkai seludang dan tongkol. Bunga betinanya terletak di pangkal tongkol, bunga jantan disebelah atasnya, sedang diantaranya terdapat bagian yang menyempit (Amiruddin 2013).



**Gambar 2. Tanaman talas (Pawar *et al.* 2018).**

#### **4. Kandungan Kimia Tanaman**

Tanaman talas memiliki kandungan kimia antara lain alkaloid, steroid, lemak dan minyak lemak, fenol, flavonoid, tanin, saponin, protein dan karbohidrat. Pada daun talas terkandung kelompok senyawa flavonoid, seperti vicenin-2, iso-vitexin, iso-vitexin 3'-*O*-glukosida, vitexin X " - Oglucoside, iso-orientin, orientin, orientin7-*O*-glukosida, leteolin 7 -*O*glucoside. Umbi tanaman talas mempunyai kandungan senyawa seperti  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, dihidroksistreol, derivat monoester fosfat, senyawa alifatik, dan globulin yaitu sekitar 80% dari total protein umbi. Umbi talas juga mengandung asam amino seperti DL Valine, D-2-Aminobutyric acid, L-Cyctein hydroxyl, DL-Alanine, L-

Arginine, L-Cystein hydroxychloride, L-Lysine monochloride dan DL-Threonine (Subhash *et al.* 2012; Pawar *et al.* 2018).

## 5. Khasiat Tanaman

Umbi talas (*Colocasia esculenta* L.) secara empiris digunakan oleh masyarakat sebagai obat scrofula, radang kulit bernanah, psoriasis, tumor di rongga perut, berak darah, keseleo, ketombe, bisul, dan luka bakar. Sementara tangkai dan daunnya digunakan untuk pengobatan urticaria, diare dan pembalut luka. Hal tersebut dikarenakan tanaman talas mengandung senyawa-senyawa polifenol dan saponin (Hibai *et al.* 2015).

Penelitian Widowati *et al.* (2016) menyatakan bahwa isolat fungi endofit umbi talas memiliki aktivitas antifungi terhadap *F. oxysporum*. Pada penelitian lainnya Rosita (2018) isolat mikroba endofit pada tangkai daun tanaman talas diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus epidermis*. Kandungan alkaloid dari ekstrak etanol umbi talas juga diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus mutans* dan *Vibrio cholera* (Hibai *et al.* 2015).

### D. *Staphylococcus aureus*

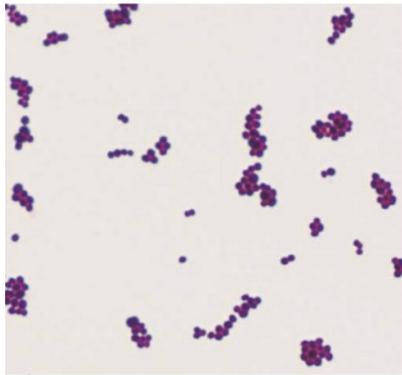
#### 1. Klasifikasi Bakteri

Menurut Jawetz *et al.* (2013) klasifikasi *Staphylococcus aureus* yaitu :

Domain	: Bacteria
Kerajaan	: Eubacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

## 2. Morfologi Bakteri

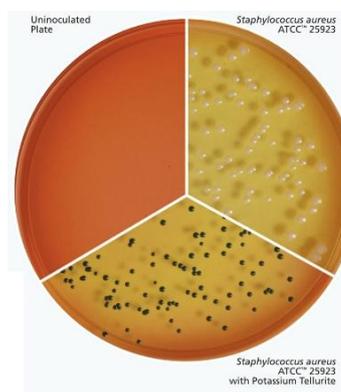
*S. aureus* adalah bakteri berbentuk bulat, bersifat Gram positif, biasanya tersusun dalam rangkaian tidak beraturan seperti buah anggur. *S. aureus* mengandung polisakarida dan protein yang berfungsi sebagai antigen dan merupakan substansi penting di dalam struktur dinding sel, tidak membentuk spora dan flagel (Jawetz *et al.* 2013).



Gambar 3. Morfologi *S. aureus* (Jawetz *et al.* 2013).

## 3. Sifat Kultur

*S. aureus* tumbuh dengan baik pada berbagai media bakteriologik dibawah suasana aerobik dan tumbuh dengan cepat pada temperatur 37°C. Namun pembentukan pigmen yang terbaik adalah pada temperatur kamar 20 – 25 °C. Koloni pada media yang padat akan berbentuk bulat, halus, menonjol, dan berkilau-kilau, membentuk berbagai pigmen berwarna kuning keemasan (Jawetz *et al.* 2013).



Gambar 4. Koloni *S. aureus* pada media VJA (Difco dan BBL Team 2009).

#### 4. Patogenesis Bakteri

*S. aureus* mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigenik dan merupakan substansi penting di dalam struktur dinding sel. Peptidoglikan merupakan suatu polimer polisakarida yang mengandung subunit-subunit yang tergabung merupakan eksoskeleton yang kaku pada dinding sel. Peptidoglikan dirusak oleh asam kuat atau lisozim. Hal tersebut penting dalam patogenesis infeksi yaitu merangsang pembentukan interleukin-1 (pirogen endogen) dan antibodi opsonik, juga dapat menjadi penarik kimia (kemotraktan) leukosit polimorfonuklear, mempunyai aktifitas mirip endotoksin dan mengaktifkan komplemen (Jawetz *et al.* 2013).

Faktor virulensi *S. aureus* yang dapat menyebabkan infeksi meliputi pertama protein permukaan yang mempromosikan kolonisasi dalam jaringan hospes (protein A, adesin, hemagglutinin, glikoprotein, fibrionectin). Kedua, invasin membantu bakteri menyebar dalam jaringan (leukocidin, kinase, hyaluronidase). Ketiga, faktor permukaan yang menghalangi fagositosis (kapsul, protein A). Keempat, faktor biokimia yang meningkatkan ketahanan bakteri di dalam fagosit (carotenoid, produksi katalase). Kelima, reaksi imunologis (protein A, coagulase, clotting factor). Keenam, toksin perusak membran (hemolysin, leukotoxin, leukocidin) dan juga eksotoksin dalam jaringan menimbulkan kerusakan dan gejala penyakit (Dewi 2013).

#### 5. Mekanisme Resistensi

Menurut penelitian Marhamah (2016) di UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Lampung, diperoleh presentase terbesar resistensi bakteri *S. aureus* yaitu terhadap antibiotik tetrasiklin 68,2%, amoksisilin 77,8%, ampisilin 82,6% dan ceftrazidime 82,6%.

Beberapa mekanisme timbulnya resistensi terhadap suatu antibiotik terjadi berdasarkan salah satu atau lebih mekanisme yaitu produksi  $\beta$ -Lactamase dibawah kontrol plasmid dan membuat organisme resisten terhadap antibiotik golongan penisilin (penisillin G, ampisillin, ticarcillin, piperacilin dan obat-obatan sejenis). Plasmid ditransmisikan oleh transduksi dan konjugasi.

Resisten terhadap nafcillin (methicillin dan oxacillin) tidak tergantung pada produksi  $\beta$ -Lactamase. Resisten terhadap nafcillin dikodekan dan diatur oleh urutan gen pada suatu kromosom yang disebut *Staphylococcal Cassette Chromosom mec* (SCCmec). Secara khusus, gen *mecA* pada lokus ini mengkode protein penisillin afinitas rendah (PBP2a) yang berperan dalam resistensi. Ada 12 jenis SCCmec berbeda. Jenis I, II dan III berhubungan dengan infeksi yang didapat di rumah sakit dan mungkin mengandung gen yang menyandikan resistensi terhadap antimikroba lainnya. SCCmec tipe IV pada prinsipnya ditemukan di komunitas yang Methicillin-Resistens *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) cenderung kurang resisten, lebih mudah ditransmisikan dan bertanggung jawab atas wabah pada dekade terkahir di Amerika Serikat dan beberapa negara Eropa.

Di Amerika Serikat, *S. aureus* dan *S. lugdunensis* dianggap rentan terhadap vankomisin jika konsentrasi hambat minimum (KHM) adalah 2  $\mu\text{g/mL}$  atau kurang, rentan menengah jika KHM adalah 4-8  $\mu\text{g/mL}$  dan resisten jika KHM 16  $\mu\text{g/mL}$  atau lebih. Umumnya diisolasi dari pasien dengan infeksi kompleks yang telah lama menerima terapi vankomisin. Seringkali vankomisin mengalami kegagalan pengobatan. Mekanisme resisten terkait dengan sintesis dinding sel dan perubahan dalam dinding sel dan tidak disebabkan oleh gen *van* yang ditemukan di enterococci. *S. aureus* rentan menengah terhadap vankomisin biasanya resisten nafcillin tetapi umumnya rentan terhadap oxazolidinone dan quinupristin-dalfopristin.

Beberapa plasmid-mediate juga resisten terhadap tetrasiklin, eritromicin dan aminoglikosida. Selain itu, adanya toleransi yang dimaksud bahwa staphylococci dihambat oleh obat tetapi tidak terbunuh olehnya, yaitu ada perbedaan besar antara hambat minimal dan konsentrasi bunuh minimal obat antimikroba. Pasien dengan endokarditis yang disebabkan oleh *S. aureus* yang toleran mungkin memiliki proses klinis yang berkepanjangan dibandingkan dengan pasien endokarditis yang disebabkan oleh *S. aureus* yang rentan. Toleransi

terkadang dikaitkan dengan kurangnya aktivasi enzim autolitik di dinding sel (Jawetz *et al.* 2013)

## **E. Fermentasi**

Fermentasi berasal dari kata *fervere* (Latin) yang artinya mendidihkan. Fermentasi digunakan untuk proses penguraian metabolik senyawa organik oleh mikroorganisme yang menghasilkan energi dan umumnya berlangsung pada keadaan anaerob dengan pembebasan gas (Kumala 2014).

Menurut Kumala (2014) berdasarkan media, fermentasi dapat dibedakan menjadi dua, yaitu:

### **1. Fermentasi media padat**

Fermentasi media padat merupakan fermentasi yang dilakukan dengan menggunakan substrat tidak larut dan tidak mengandung air bebas, tetapi cukup mengandung air yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba. Pada fermentasi ini mikroorganisme ditumbuhkan pada permukaan media padat, sehingga juga dapat disebut sebagai fermentasi permukaan. Fermentasi media padat dapat digunakan untuk produksi enzim dan asam organik yang menggunakan kapang.

### **2. Fermentasi media cair**

Fermentasi media cair merupakan fermentasi yang biasanya dilakukan dengan substrat yang larut atau tersuspensi dalam fase cair. Fermentasi ini juga disebut dengan fermentasi media kultur terendam yang umumnya memerlukan aerasi dan agitasi. Pada fermentasi ini yang biasanya digunakan sebagai inokulum adalah bakteri, kapang, dan khamir.

Berdasarkan metode, fermentasi juga terbagi dua, yaitu:

### **3. Fermentasi metode goyang**

Metode fermentasi goyang merupakan metode fermentasi yang pada prosesnya menggunakan alat pengocok *rotary* atau *orbital*, dan *reciprocating*. Di antara kedua alat pengocok tersebut, alat pengocok *rotary* lebih sering digunakan.

Pada alat *rotary*, kultur berputar didalam labu pada kecepatan 120 rpm. Sementara itu, pada mesin pengocok *reciprocating*, kultur bergerak ulang-alik, ke depan dan ke belakang yang dapat menyebabkan percikan medium yang merupakan kelemahan dari pemakaian *reciprocating* ini. Wadah yang biasanya digunakan pada metode fermentasi goyang ini adalah labu erlenmeyer atau tabung reaksi besar.

#### **4. Fermentasi metode diam**

Metode fermentasi diam ini menggunakan labu Erlenmeyer sebagai wadahnya, metode ini dilakukan dengan cara mendiamkan wadah selama masa inkubasi tanpa ada guncangan. Idealnya, media fermentasi yang diisikan ke dalam wadah fermentasi adalah 20% dari volume wadah tersebut.

Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi proses fermentasi adalah (Kumala 2014):

##### **1. Substrat dan nutrien**

Media fermentasi yang digunakan harus menyediakan semua nutrien yang dibutuhkan oleh mikroba untuk pertumbuhan dan memperoleh energi. Beberapa substrat dapat digunakan sebagai sumber karbon adalah pati dan molase. Sementara itu, garam amonium, urea, nitrat, tepung dan kedelai dapat digunakan sebagai sumber nitrogen.

##### **2. Keasaman (pH)**

Berada pada pH optimum selama masa fermentasi. Pada umumnya bakteri memiliki pH optimum dalam rentang 6,7-7,5 dan tidak dapat tumbuh pada pH dibawah 5,5 dan diatas 8,5. Sedangkan Khamir memiliki pH optimum pada rentang 2,5-8,5. Sementara itu, pH optimum kapang berada diantara antara 5 dan 7, tetapi masih dapat tumbuh pada rentang pH 3-8,5.

##### **3. Suhu**

Suhu pada saat proses fermentasi harus di perhatikan karena dapat membuat mikroorganisme mati atau tidak berkembang apabila suhu terlalu tinggi atau terlalu rendah. Sebagian besar mikroorganisme hanya dapat tumbuh pada

rentang suhu 20-30°C

#### 4. Aerasi dan Agitasi

Aerasi bertujuan agar pasokan oksigen cukup memadai, untuk pengukuran pH harus dilakukan agar media yang digunakan mempertahankan kondisi aerobik dan membuang gas karbondioksida yang dihasilkan selama fermentasi. Agitasi bertujuan meratakan penyebaran mikroorganisme, nutrisi, dan oksigen didalam medium.

### F. Uji Aktivitas Antibakteri

Menurut Pratiwi (2008) uji aktivitas antibakteri terdiri atas 2 metode yaitu sebagai berikut:

#### 1. Metode Difusi

**1.1. Metode *disc diffusion* (tes Kirby & Bauer).** Metode ini untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar.

**1.2. *E-test*.** Metode *E-test* digunakan untuk mengestimasi *minimum inhibitory concentration* (MIC) atau kadar hambat minimum (KHM) yaitu konsentrasi minimal suatu agen antimikroba untuk dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Pada metode ini digunakan strip plastik yang mengandung agen antimikroba dari kadar terendah hingga kadar tertinggi dan digerakkan pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroorganisme. Pengamatan dilakukan pada area jernih yang ditimbulkannya yang menunjukkan kadar agen antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media agar.

**1.3. Ditch-plate technique.** Pada metode ini sampel uji berupa agen antimikroba yang diletakkan pada parit yang dibuat dengan cara memotong media agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur dan mikroba uji (maksimum 6 macam) digoreskan ke arah parit yang berisi agen antimikroba. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Diamati ada atau tidaknya zona hambat terhadap pertumbuhan mikroba uji disekeliling parit.

**1.4. Cup-plate technique.** Metode ini serupa dengan metode *disc diffusion*, yaitu dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antimikroba yang akan diuji. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Diamati ada atau tidaknya zona hambat terhadap pertumbuhan mikroba uji disekeliling sumur.

**1.5. Gradient-plate technique.** Pada metode ini konsentrasi agen antimikroba pada media agar secara teoritis bervariasi dari 0 hingga maksimal. Media agar dicairkan dan larutan uji ditambahkan. Campuran kemudian dituang ke dalam cawan petri dan diletakkan dalam posisi miring. Nutrisi kedua selanjutnya dituang di atasnya. *Plate* diinkubasi selama 24 jam untuk memungkinkan agen antimikroba berdifusi dan permukaan media mengering. Mikroba uji (maksimal 6 macam) digoreskan pada arah mulai dari konsentrasi tinggi ke rendah (Pratiwi 2008).

## **2. Metode Dilusi**

**2.1. Dilusi cair/broth dilution test (serial dilution).** Metode ini mengukur kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada media cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun

agen antimikroba dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai KBM.

**2.2. Dilusi padat/solid dilution test.** Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid). Prinsipnya adalah sejumlah antimikroba diencerkan hingga diperoleh beberapa konsentrasi dan tiap konsentrasi obat dicampur dalam media agar, lalu ditanami bakteri dan diinkubasi. Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba (Pratiwi 2008).

## G. Landasan Teori

Pencarian senyawa bioaktif terus-menerus dilakukan karena meningkatnya insidensi resistensi penggunaan antibiotik. Menurut penelitian Marhamah (2016) di UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Lampung, diperoleh presentase terbesar resistensi bakteri *S. aureus* yaitu terhadap antibiotik tetrasiklin 68,2%, amoksisilin 77,8% , ampisilin 82,6% dan ceftrazidime 82,6%. Salah satu mekanisme resistensi terhadap suatu antibiotik yaitu bakteri mensintesis suatu enzim inaktivator atau penghancur antibiotik, misalnya *Staphylococcus* resisten terhadap penisilin G karena bakteri menghasilkan enzim  $\beta$ -laktamase yang menyerang cincin  $\beta$ -laktam sehingga antibiotik menjadi tidak aktif (Jawetz *et al.* 2013).

*S. aureus* mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigenik dan merupakan substansi penting di dalam struktur dinding sel. Peptidoglikan merupakan suatu polimer polisakarida yang mengandung subunit-subunit yang tergabung, merupakan eksoskeleton yang kaku pada dinding sel. Peptidoglikan dirusak oleh asam kuat atau lisozim. Hal tersebut penting dalam patogenesis infeksi (Jawetz *et al.* 2013). Umbi dari tanaman talas diketahui mengandung senyawa alkaloid yang dapat mengatasi infeksi tersebut dengan menghambat pertumbuhan *S. aureus* patogen (Hibai *et al.* 2015).

Sumber senyawa bioaktif salah satunya berasal dari mikroba endofit. Mikroorganisme endofit dapat hidup bersimbiosis dengan tanaman inangnya dan dapat menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki bioaktivitas seperti zat antibakteri (Tan dan Zou 2001). Bakteri endofit dapat diisolasi dari permukaan jaringan tanaman yang steril atau diekstraksi dari jaringan tanaman bagian dalam. Bakteri endofit Gram positif dan Gram negatif telah banyak diisolasi dari beberapa jaringan tanaman. Bakteri endofit masuk ke dalam jaringan tanaman terutama melalui akar dan bagian tanaman lain yang terpapar udara luar seperti bunga, batang dan kotiledon dapat juga dilalui. Secara khusus, bakteri endofit masuk ke jaringan yang berkecambah, akar, stomata maupun jaringan yang rusak (Zinniel *et al.* 2002).

Penelitian Widowati *et al.* (2016) menyatakan bahwa mikroorganisme endofit dapat diisolasi dari umbi tanaman talas dan terbukti memiliki aktivitas antifungi terhadap *F. Oxysporum* dalam hal ini terjadi interaksi antara mikroba dan tanaman inangnya yang melibatkan transfer materi genetik bahwa zat-zat bioaktif senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh tanaman tertentu dihasilkan pula oleh mikroba-mikroba endofit yang hidup di dalam nya (Strobel 2002).

Penelitian Zulkifli (2018) menyatakan hasil karakterisasi bakteri endofit dari kulit batang tanaman srikaya yaitu pada kelompok genus Bacillus. Menurut Strobel *et al.* (2004) bakteri endofit dari genus Pseudomonas, Burkholderia dan Bacillus memproduksi metabolit sekunder seperti Taxol sebagai antibiotik dan anticancer, asam Cytonic B sebagai antivirus, Oocydin sebagai insektisidal dan beberapa immunosupresor. Bacillus tersebar luas di alam dan mengkontaminasi setiap komunitas pertanian. Bacillus dapat diisolasi dari tanah, debu, cereal, tanaman, rambut hewan dan air tawar (Jenson dan Moir 2003).

Bakteri endofit dapat diisolasi dari jaringan tanaman dan ditumbuhkan pada medium fermentasi tertentu. Proses fermentasi bakteri endofit dengan media cair lebih efektif untuk memproduksi biomassa dan senyawa bioaktif dibandingkan fermentasi dalam media padat (Pokhrel dan Ohga 2007). Di dalam

medium fermentasi tersebut bakteri endofit umumnya dapat menghasilkan senyawa sejenis yang terkandung pada tanaman inangnya. Proses waktu fermentasi yang dilakukan untuk produksi senyawa bioaktif dari bakteri dilihat dari kurva pertumbuhan bakteri. Penelitian Elita *et al.* (2013) menyatakan bahwa kultur umur 72 jam (hari ke-3) merupakan waktu optimum produksi senyawa antibakteri dari bakteri endofit *Pseudomonas* terhadap bakteri patogen *E. coli* dan *S. aureus*. Begitupula dengan penelitian El-Shestawy *et al.* (2015) dan Jaysree *et al.* (2011) menunjukkan bahwa fase stasioner dari kurva pertumbuhan bakteri bacillus yaitu pada kisaran kultur umur 72-78 jam.

#### **H. Hipotesis**

Berdasarkan uraian di atas, maka dapat disusun hipotesis dalam penelitian ini, yaitu :

Pertama, bakteri endofit dari umbi tanaman talas mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* ATCC 25923.

Kedua, dapat diketahui nilai daya hambat aktivitas antibakteri yang dihasilkan dari tiap waktu fermentasi bakteri endofit umbi tanaman talas.

Ketiga, waktu optimum fermentasi bakteri endofit umbi tanaman talas yang memiliki aktivitas antibakteri terbesar pada hari ke-3.