

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Pembuatan suspensi bakteri uji berdasarkan *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2017) untuk uji aktivitas antibakteri distandarkan dengan larutan Mc Farland 0,5. Mc Farland adalah penyetaraan konsentrasi mikroba dengan menggunakan larutan BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1%. Standar kekeruhan Mc Farland dimaksudkan untuk memperkirakan kepadatan sel bakteri yang akan digunakan pada pengujian antibakteri. Larutan standar Mc Farland 0,5 ekuivalen dengan suspensi sel konsentrasi 1,5 x 10⁸ cfu/ml (Andrews 2008). Berdasarkan hasil penyetaraan yaitu standar kekeruhan suspensi bakteri uji telah sama dengan Larutan Mc Farland 0,5. Gambar suspensi bakteri uji dapat dilihat dalam lampiran 1.

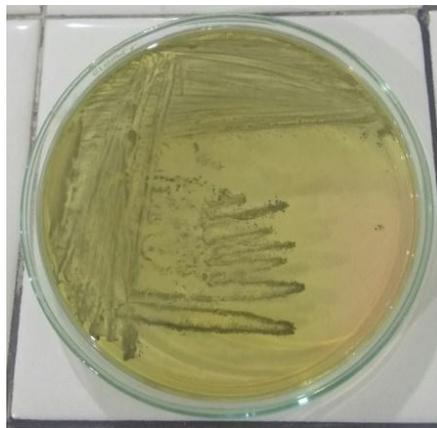
B. Identifikasi Bakteri Uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Identifikasi bakteri uji untuk mengetahui dan menentukan ciri-ciri bakteri uji yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri dan memastikan bahwa bakteri uji yang digunakan benar-benar murni tanpa adanya kontaminasi. Identifikasi dilakukan dengan: (1) uji morfologi; (2) pewarnaan gram; (3) uji katalase; dan (4) uji koagulase (Lestari *et al.* 2018)

1. Uji Morfologi

Pengamatan morfologi bakteri uji *S. aureus* dilakukan pada media selektif yaitu VJA dengan menggunakan metode gores. VJA digunakan untuk menghambat semua pertumbuhan bakteri Gram negatif. Media ini sebelum digunakan berwarna merah. Berdasarkan uji morfologi *S. aureus* ATCC 25923 diperoleh hasil koloni bakteri berbentuk bulat kecil, berwarna hitam dan media disekitar koloni berwarna kuning. Menurut Suwandi (1999) *S. aureus* pada media VJA membentuk koloni hitam karena mampu mereduksi kalium tellurite yang

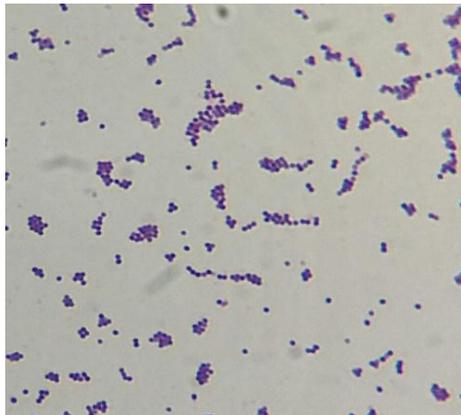
ditambahkan pada media menjadi logam tellurium dan media disekitar koloni berubah menjadi kuning. Hal tersebut disebabkan karena pada media VJA terdapat indikator warna yaitu *phenol red* yang akan berubah menjadi warna kuning ketika manitol diubah dalam suasana asam atau adanya reaksi fermentasi manitol.



Gambar 8. Pengamatan morfologi koloni *S. aureus* ATCC 25923 pada media VJA.

2. Pewarnaan Gram

S. aureus adalah bakteri Gram positif dengan diameter 0,5-1,0 mm, berbentuk serangkaian buah anggur, tidak membentuk spora dan tidak bergerak (Jawetz *et al.* 2013). Berdasarkan pewarnaan Gram *S. aureus* ATCC 25923 diperoleh hasil sel bakteri berbentuk kokus dalam rangkaian tidak beraturan seperti buah anggur berwarna ungu. Lay (1994) menyatakan bahwa bakteri Gram positif berwarna ungu disebabkan kompleks zat warna kristal violet-yodium tetap bertahan meskipun diberi larutan pemucat. Perbedaan struktur luar dinding sel bakteri Gram positif dan negatif mengakibatkan terjadinya perbedaan warna pada akhir prosedur pewarnaan Gram. Dinding sel terluar bakteri Gram positif terdiri dari peptidoglikan tebal tanpa lapisan lipoprotein atau lipopolisakarida sedangkan bakteri Gram negatif memiliki dinding selnya terdiri dari peptidoglikan tipis yang dibungkus oleh lapisan lipoprotein atau lipopolisakarida (Ijong 2015).



Gambar 9. Pewarnaan Gram *S. aureus* ATCC 25923.

3. Uji Katalase

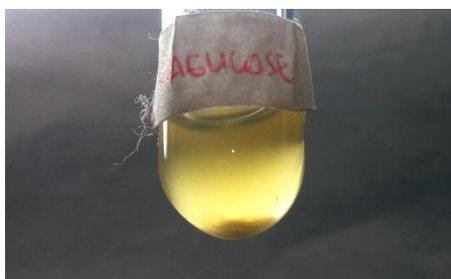
Toelle *et al.* (2014) menyatakan bahwa katalase positif ditunjukkan adanya gelembung gas (O_2) yang diproduksi oleh genus *Staphylococcus*. *Staphylococcus sp* menggunakan katalase untuk melindungi dari hidrogen peroksida (H_2O_2) dengan mengubahnya menjadi air dan oksigen (Locke *et al.* 2013). Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena bahan ini menginaktifkan enzim dalam sel. Hidrogen peroksida terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob pasti menguraikan bahan tersebut (Lay 1994). Berdasarkan hasil uji katalase *S. aureus* ATCC 25923 yaitu bersifat katalase positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas (O_2) setelah bercampur dengan H_2O_2 .



Gambar 10. Katalase positif *S. aureus* ATCC 25923.

4. Uji Koagulase

Andreasen (2008) menyatakan bahwa koagulase positif umumnya dihasilkan oleh *S. aureus*, namun ditemukan juga *S. aureus* koagulase negatif. Koagulase negatif bertindak sebagai patogen oportunistik (Yurdakul *et al.* 2013). Koagulase merupakan salah satu protein yang menyerupai enzim dan dapat menggumpalkan plasma oksalat atau sitrat dengan bantuan suatu faktor yang terdapat dalam serum. Faktor reaksi koagulase serum bereaksi dengan koagulase untuk menghasilkan esterase dan aktivitas pembekuan dengan cara yang sama, yaitu pengaktifan protrombin menjadi trombin (Jawetz *et al.* 2001). Enzim koagulase bereaksi terhadap bentuk kompleks yang dapat mengkatalis perubahan fibrinogen menjadi bekuan fibrin. Fibrin juga tersimpan pada permukaan *S. aureus* yang mampu melindungi bakteri dari kerusakan sel akibat aksi fagositosis sel. Berdasarkan hasil uji koagulase *S. aureus* ATCC 25923 yaitu bersifat koagulase positif ditunjukkan dengan menggumpalnya serum plasma darah kelinci pada dasar tabung.



Gambar 11. Koagulase positif *S. aureus* ATCC 25923.

C. Pembuatan Kultur Bakteri Endofit

Bakteri endofit umbi tanaman talas diperoleh dari penelitian sebelumnya di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta yang diberi kode bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* (ECE1) dan bakteri endofit *Bacillus siamensis* (ECE4). Kultur bakteri endofit dilakukan dengan meremajakan masing-masing bakteri endofit *P. knackmussii* dan *B. siamensis* yang diinokulasikan menggunakan Ose dengan cara digoreskan pada media NA miring (*Nutrient Agar*)

dalam tabung rekasi. Tujuan dari kultur bakteri endofit adalah untuk memperbanyak bakteri sebagai stok kultur yang digunakan pada prosedur pengujian aktivitas antibakteri. Gambar hasil kultur bakteri endofit dapat dilihat dalam lampiran 2.

D. Identifikasi Bakteri Endofit

Identifikasi bakteri endofit *P. knackmussii* yang merupakan bakteri Gram negatif dilakukan dengan: (1) uji morfologi; (2) pewarnaan Gram; dan (3) uji biokimia yang terdiri dari SIM, KIA, LIA dan citrat. Sedangkan identifikasi bakteri endofit *B. siamensis* yang merupakan bakteri Gram positif dilakukan dengan: (1) uji morfologi; (2) pewarnaan Gram; dan (3) pewarnaan spora.

Bakteri endofit pada penelitian sebelumnya Wulandari dan Desi (2018) telah dilakukan identifikasi molekuler dengan menggunakan marka gen 16S rRNA. Marka gen 16S rRNA adalah subunit kecil penyusun ribosom pada semua organisme prokariot, sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri (Madigan *et al.* 2009). Sekuen 16S rRNA dianggap mampu mewakili seluruh informasi filogenetik dan lebih praktis. Gen 16S rRNA terdapat di semua organisme prokariot yaitu berupa sekuen konservatif dan sekuen variatif yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri melalui perbedaan dan variasi urutan pasang basanya (Bottger 1996). Hasil identifikasi bakteri endofit berdasarkan marka 16S rRNA dapat dilihat dalam lampiran 8 dan 9.

1. Uji Morfologi

Identifikasi morfologi sel dilakukan untuk mengetahui ukuran, bentuk, rangkaian sel dan sifat Gram bakteri sehingga dapat diketahui struktur selnya. Identifikasi morfologi bakteri endofit *P. knackmussii* dilakukan dengan cara diinokulasikan pada media selektif PSA dan bakteri endofit *B. siamensis* pada media NA. Setelah terbentuk koloni pada permukaan agar cawan, maka dilakukan pengamatan pada pertumbuhan, bentuk, permukaan, elevasi dan bentuk tepi koloni (Jutono *et al.* 1980).

Tabel 1. Uji Morfologi

Morfologi Koloni yang diamati	Morfologi Koloni Bakteri Endofit <i>Pseudomonas knackmussii</i>	Morfologi Koloni Bakteri Endofit <i>Bacillus siamensis</i>
Media	PSA	NA
Warna Koloni	Hijau	Krim Keputihan
Bentuk Koloni	Bulat kecil	Bulat Besar
Permukaan	Mengkilap	Kasar
Elevasi	Cembung	Cembung
Bentuk Tepi	Rata	Rata

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi bakteri endofit *P. knackmussii* pada media PSA membentuk pigmen pioverdin yaitu koloni bakteri yang berwarna hijau dan berbentuk bulat kecil, permukaannya mengkilap, elevasi cembung dan bentuk tepi rata. Hal tersebut sesuai dengan literatur yang menyatakan bahwa *Pseudomonas* membentuk pigmen pioverdin yaitu koloni bakteri berwarna kehijau-hijauan, berfluoresensi, larut dalam air dan tidak larut dalam kloroform, dapat terbentuk disebabkan oleh adanya magnesium klorida dan kalium sulfat yang terkandung dalam media PSA (Sulviana *et al.* 2017). Sedangkan hasil pengamatan morfologi bakteri endofit *B. siamensis* yaitu koloni bakteri berwarna krim keputihan, berbentuk bulat dan besar, permukaannya kasar, elevasi cembung dan bentuk tepi rata. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Mukamto (2015) yang menyatakan bahwa karakteristik bakteri *Bacillus sp* pada media NA bermacam-macam tetapi pada umumnya koloni berwarna putih sampai kekuningan, tepi rata, permukaannya kasar, tidak berlendir bahkan ada cenderung kering bubuk, koloni besar dan tidak mengkilat. Gambar hasil uji morfologi bakteri endofit dapat dilihat dalam lampiran 3 dan 4.

2. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk membedakan bakteri yang bersifat Gram positif dan Gram negatif. Pewarnaan Gram ini dilakukan melalui 4 tahapan yaitu pemberian cat utama (larutan kristal violet), pengintensifan cat utama dengan menambahkan larutan mordan, pencucian dengan larutan peluntur (alkohol), dan pemberian cat penutup (cat lawan) larutan safranin.

Tabel 2. Pewarnaan Gram

Bakteri Endofit	Morfologi		Gram
	Bentuk	Warna	
<i>Pseudomonas knackmussii</i>	Basil	Merah	Negatif
<i>Bacillus siamensis</i>	Basil	Ungu	Positif

Bakteri Gram positif memberikan warna ungu, hal ini disebabkan karena dinding sel bakteri ini tersusun atas peptidoglikan yang tebal sehingga bakteri Gram positif mengalami denaturasi protein pada dinding selnya akibat pencucian dengan alkohol. Protein menjadi keras dan beku, pori-pori mengecil dan permeabilitas membran sel berkurang sehingga kompleks kristal violet yang berwarna ungu dipertahankan dan bakteri tetap berwarna ungu. Sedangkan bakteri Gram negatif memberikan warna merah karena lipid yang terdapat didalam dinding selnya larut pada waktu pencucian dengan alkohol sehingga pori-pori dan dinding sel membesar dan menyebabkan terlepasnya kompleks kristal violet yang diserap sebelumnya dan bakteri berwarna merah setelah diberikan safranin (Brown 2001).

Berdasarkan pewarnaan Gram pada bakteri endofit *P. knackmussii* diperoleh hasil sel bakteri berbentuk batang dan berwarna merah. Hal tersebut sesuai dengan literatur yang menyatakan bahwa bakteri *Pseudomonas* tergolong bakteri Gram negatif dimana pada pewarnaan Gram menghasilkan warna merah karena tidak menahan kompleks zat warna iodin dan menjadi translusen, bakteri ini dapat diwarnai lagi dengan safranin (zat berwarna merah) (Jawetz *et al.* 2012). Sedangkan pewarnaan Gram pada bakteri endofit *B. siamensis* diperoleh hasil sel bakteri berbentuk batang dan berwarna ungu. Hal tersebut sesuai dengan literatur yang menyatakan bahwa bakteri *Bacillus* tergolong bakteri Gram positif dimana pada pewarnaan Gram menghasilkan warna ungu karena memiliki afinitas terhadap kristal violet pada dinding selnya sehingga bakteri tidak dapat didekolorisasi dengan alkohol dan tidak dapat diwarnai oleh safranin (Lay 1994). Gambar hasil uji pewarnaan Gram bakteri endofit dapat dilihat dalam lampiran 5.

3. Pewarnaan Spora

Pewarnaan spora dilakukan untuk mengetahui apakah suatu bakteri memiliki spora atau tidak dan mengetahui letak dari spora bakteri tersebut. Spora bakteri adalah bentuk bakteri dalam mempertahankan diri dari pengaruh lingkungan luar. Spora akan lebih tahan lama dalam keadaan yang ekstrim, misalnya dalam keadaan kering, panas atau adanya bahan kimia yang beracun. Menurut Hadioetomo (1993) spora juga tahan terhadap pewarnaan. Spora yang telah berhasil diwarnai akan sulit melepaskan zat warna yang telah diserap sehingga tidak dapat mengikat zat warna yang diberikan berikutnya. Hal ini disebabkan karena spora memiliki selubung yang keras dan tebal (Sunatmo 2007). Zat warna yang digunakan dalam pewarnaan spora adalah *malachite green* yang tetap diikat oleh spora bakteri setelah pencucian dengan larutan safranin. Spora terlihat berwarna hijau-biru dan sel vegetatif akan berwarna merah.

Berdasarkan pewarnaan spora pada bakteri endofit *B. siamensis* diperoleh hasil sel bakteri memiliki spora yang terletak didekat ujung (sub terminal). Hal tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya Wulandari dan Desi (2018) yang menyatakan bahwa bakteri endofit *B. siamensis* memiliki spora sedangkan untuk bakteri endofit *P. knackmussii* tidak berspora. Gambar hasil uji pewarnaan spora bakteri endofit dapat dilihat dalam lampiran 6.

4. Uji Biokimia

Berdasarkan penelitian sebelumnya Wulandari dan Desi (2018) yang menyatakan bahwa uji biokimia bakteri endofit *P. knackmussii* pada media KIA yaitu K/K S(-), media SIM yaitu (-++), media LIA yaitu K/K S(-) dan pada media citrat yaitu +. Hal tersebut sesuai dengan hasil uji biokim yang dilakukan pada tabel berikut:

Tabel 3. Uji Biokimia Bakteri Endofit *Pseudomonas knackmussii*

Pengujian	Hasil	Pustaka
SIM	-++	-++
KIA	K/K S(-)	K/K S(-)
LIA	K/K S(-)	K/K S(-)
Citrat	+	+

Keterangan:

SIM	: Sulfida Indol Mortility	A	: Kuning
KIA	: Kligers Iron Agar	K	: Merah atau Ungu
LIA	: Lysin Iron Agar	S	: Hitam
+	: Reaksi positif	G	: Gas
-	: Reaksi negatif		

Uji pada medium KIA untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Hasil uji KIA menunjukkan pada lereng dan dasar media berwarna merah serta tidak terbentuk warna hitam dan tidak terbentuknya gas K/K S(-). Bakteri *Pseudomonas* tidak membentuk asam karena bakteri yang tidak dapat memfermentasi glukosa dan laktosa, dan tidak membentuk warna hitam (H_2S negatif) (Harti 2015).

Uji pada medium SIM menunjukkan (-++) yaitu bakteri endofit *Pseudomonas* tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfida yang menyebabkan media tidak berwarna hitam. Penambahan tiga tetes Erlich A dan B pada permukaan media menyebabkan terbentuknya cincin berwarna merah muda. Hal ini berarti uji indol positif menghasilkan triptopanase sebagai sumber karbon. Uji motilitas positif ditunjukkan dengan penyebaran pertumbuhan di media SIM.

Uji pada medium LIA untuk mengetahui deaminasi lisin dan pembentukan sulfida. Pengujian dengan medium LIA menunjukkan hasil K/K S(-), K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak membentuk deaminasi lisin tetapi membentuk dekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) di seluruh media, S(-) artinya uji H_2S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA.

Uji pada medium Citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Hasil uji citrat yaitu positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan bakteri dan terjadinya perubahan warna media dari hijau menjadi biru yang disebabkan oleh peningkatan pH media di atas 7,6 karena adanya ammonia yang dihasilkan yang berasal dari monoammonium

phosphate yang terdapat pada media (Sardiani *et al.* 2015). Gambar hasil uji biokimia bakteri endofit dapat dilihat dalam lampiran 7.

E. Fermentasi Bakteri Endofit

Fermentasi bertujuan untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang diproduksi oleh bakteri endofit. Fermentasi dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri endofit dengan menggunakan media cair BHI sebanyak 80 ml dalam Erlenmayer dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 hari. Setiap harinya fermentasi bakteri endofit digojog selama 15 menit. Penggojogan merupakan metode pemanfaatan medium oleh mikroorganisme yang hasilnya lebih efisien, mempercepat pertumbuhan isolat dan pertumbuhan yang dihasilkan lebih homogen (Rante 2013). Proses fermentasi dengan menggunakan medium cair karena lebih efektif dalam memproduksi biomassa dan senyawa bioaktif dibandingkan medium padat (Pokhrel dan Ohga 2007). Hal ini karena dalam fermentasi cair terdapat proses agitasi yang memungkinkan nutrisi dalam media dapat terus homogen sehingga dapat lebih optimal mengabsorpsi nutrisi tersebut (Harahap *et al.* 2018).

Penelitian Elita *et al.* (2013) menyatakan bahwa kultur umur 72 jam (hari ke-3) merupakan waktu optimum produksi senyawa antibakteri dari bakteri endofit *Pseudomonas*. 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. Hal inilah yang menjadi pertimbangan dalam menentukan waktu fermentasi yang dilakukan selama 4 hari. Uji aktivitas antibakteri dimulai pada fermentasi hari ke-2 karena 24 jam pertama bakteri masih berada dalam fase lag yaitu dimana bakteri beradaptasi dengan lingkungannya dan kemungkinan kandungan metabolit yang dihasilkan masih rendah.

Hasil fermentasi bakteri endofit disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 60 menit bertujuan untuk memisahkan supernatan dan biomassa

(endapan). Supernatan yang diperoleh disimpan pada wadah vial yang dibungkus aluminium foil yang akan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri. Vial supernatan disimpan ke dalam kulkas atau pada suhu 4°C bertujuan untuk menahan perubahan zat yang ada didalamnya. Pemisahan supernatan dan biomassa dikarenakan mikroorganisme dapat mensekresikan metabolit sekunder selama proses fermentasi ke luar sel yang terdapat pada filtrat atau medium biakan (Rante 2013). Diharapkan supernatan yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri hanya mengandung senyawa metabolit antibakteri dan tidak terdapat sel bakteri endofit lagi yang dikhawatirkan akan tumbuh diatas media. Gambar hasil fermentasi bakteri endofit dapat dilihat dalam lampiran 10.

F. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dari supernatan hasil fermentasi bakteri endofit *P. knackmussii* dan *B. siamensis* terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilakukan dengan metode difusi cakram (*disc diffusion methods*) dan penentuan waktu optimum fermentasi terhadap aktivitas antibakteri terbesar ditunjukkan dengan adanya zona hambat disekitar cakram yang diukur dengan menggunakan jangka sorong. Kelebihan dari metode difusi cakram adalah dapat dilakukan pengujian secara lebih banyak dalam satu kali kegiatan, lebih mudah tidak terlalu memerlukan tenaga yang banyak dan kertas cakram mampu menyerap senyawa antibakteri dan nutrisi dari bakteri endofit untuk bertahan lebih lama diatas media.

Pada pengujian, supernatan hasil fermentasi bakteri endofit sebanyak 50µl diteteskan pada kertas cakram steril. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik ciprofloxacin 5µg. Penggunaan ciprofloxacin sebagai kontrol positif karena ciprofloxacin merupakan antibiotik spektrum luas dengan mekanisme kerja yaitu menghambat replikasi bakterial DNA dengan mengintervensi aktivitas DNA girase (topoisomerase II) dan topoisomerase IV selama pertumbuhan dan reproduksi bakteri. Penghambatan terhadap enzim yang terlibat dalam replikasi

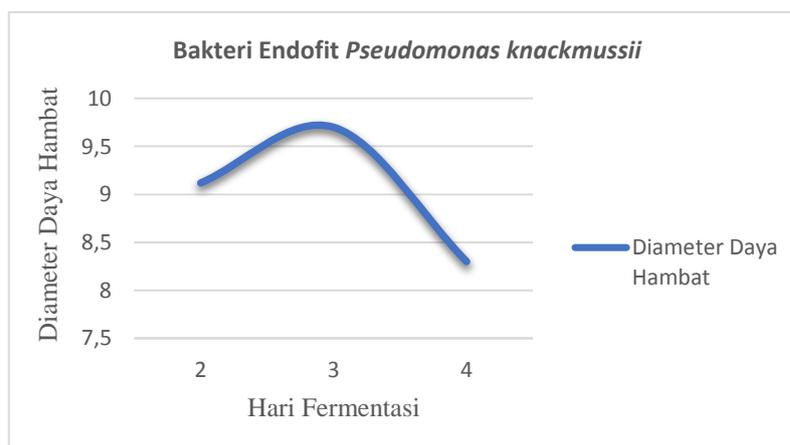
(peristiwa penggandaan DNA sebelum pembelahan sel berlangsung), rekombinasi (penggabungan gen dari satu at lebih sel ke sel target), dan reparasi (perbaikan) DNA tersebut mengakibatkan penghambatan terhadap pertumbuhan sel bakteri (Brunton 2006) sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah kertas cakram tanpa senyawa antibakteri. Kertas cakram yang telah ditetesi supernatan kemudian didiamkan selama 1 menit agar zat terserap seluruhnya ke dalam cakram kemudian diletakkan di atas media agar yang sudah diusap dengan bakteri uji dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dari pengukuran diameter zona hambat diperoleh hasil yang ditunjukkan pada tabel berikut:

Tabel 4. Nilai Diameter Zona Hambat

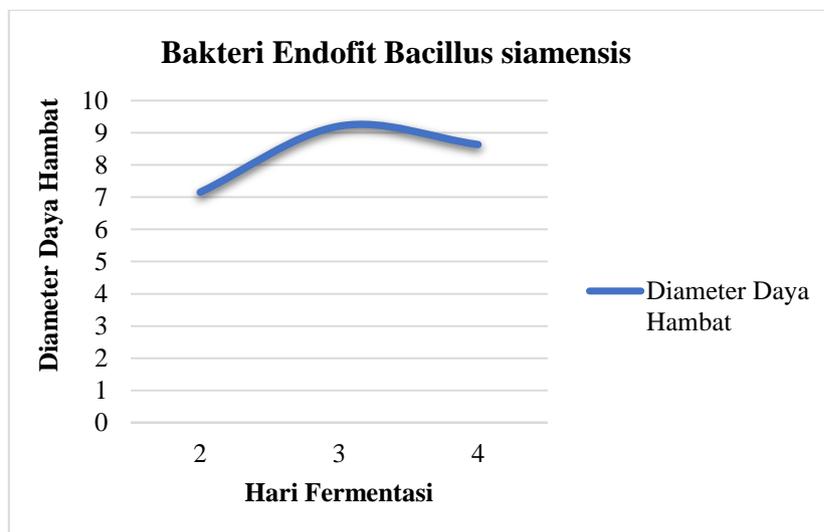
Bakteri Endofit	Kelompok	Diameter Zona Hambat (mm)			Rata-rata (mm) ± SD
		Replikasi			
		1	2	3	
<i>Pseudomonas knackmussii</i>	Kontrol Negarif (-)	0	0	0	0 ± 0
	Kontrol Positif (+)	17,47	17,27	17,42	17,39 ± 0,10
	Fermentasi Hari Ke-2	9,27	9,20	8,87	9,11 ± 0,21
	Fermentasi Hari Ke-3	9,57	9,90	9,60	9,69 ± 0,18
	Fermentasi Hari Ke-4	8,50	8,42	7,97	8,30 ± 0,28
<i>Bacillus siamensis</i>	Kontrol Negarif (-)	0	0	0	0 ± 0
	Kontrol Positif (+)	16,92	16,90	16,85	16,892 ± 0,04
	Fermentasi Hari Ke-2	7,25	7,07	7,12	7,15 ± 0,09
	Fermentasi Hari Ke-3	9,52	8,87	9,20	9,20 ± 0,32
	Fermentasi Hari Ke-4	8,67	8,47	8,72	8,62 ± 0,13

Keterangan :

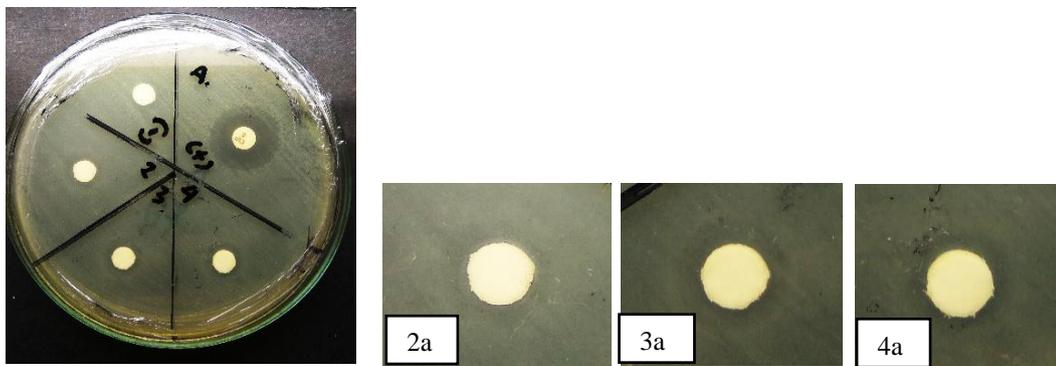
- : Kontrol negatif (kertas cakram tanpa senyawa antibakteri)
- + : Kontrol positif (antibiotik ciprofloxacin 5µg)



Gambar 12. Kurva aktivitas antibakteri dari bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii*.



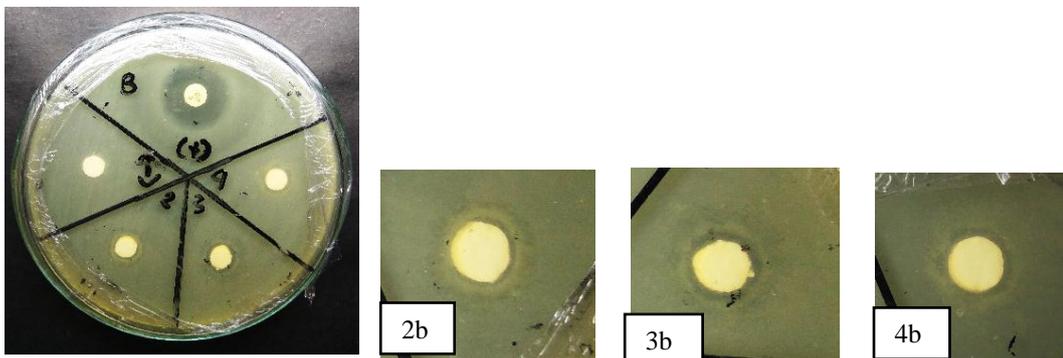
Gambar 13. Kurva aktivitas antibakteri dari bakteri endofit *Bacillus siamensis*.



Keterangan :

- (-) : Kontrol negatif (kertas cakram tanpa senyawa antibakteri)
- (+) : Kontrol positif (antibiotik ciprofloxacin 5 μ g)
- (2a) : Supernatan hasil fermentasi hari ke-2
- (3a) : Supernatan hasil fermentasi hari ke-3
- (4a) : Supernatan hasil fermentasi hari ke-4

Gambar 14. Daya hambat aktivitas antibakteri dari bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii*.



Keterangan :

- (-) : Kontrol negatif (kertas cakram tanpa senyawa antibakteri)
- (+) : Kontrol positif (antibiotik ciprofloxacin 5 μ g)
- (2b) : Supernatan hasil fermentasi hari ke-2
- (3b) : Supernatan hasil fermentasi hari ke-3
- (4b) : Supernatan hasil fermentasi hari ke-4

Gambar 15. Daya hambat aktivitas antibakteri dari bakteri endofit *Bacillus siamensis*.

Penelitian Udayakumar dan Begum (2002) menghitung total diameter zona hambat tanpa mengurangi diameter kertas cakram menyatakan bahwa aktivitas antimikroba dikategorikan tingkat sensitifitas tinggi apabila diameter zona hambat mencapai > 12 mm, sensitifitas sedang 9-12 mm, sensitifitas rendah 6-9 mm dan resisten apabila < 6 mm.

Berdasarkan hasil pada tabel 4 menunjukkan bahwa terdapatnya zona hambat yang terbentuk dimulai pada fermentasi hari ke-2, ke-3 dan ke-4 baik dari bakteri endofit *P. knackmussii* maupun *B. siamensis*. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya zona bening disekitar kertas cakram yang tidak ditumbuhi bakteri. Nilai zona hambat yang dihasilkan oleh bakteri endofit *P. knackmussii* pada fermentasi hari ke-2 sebesar 9,11 mm, hari ke-3 sebesar 9,69 mm dan hari ke-4 sebesar 8,30 mm. Sedangkan nilai zona hambat yang dihasilkan oleh bakteri endofit *B. siamensis* pada fermentasi hari ke-2 sebesar 7,15 mm, hari ke-3 sebesar 9,20 mm dan hari ke-4 sebesar 8,62 mm. Berdasarkan hasil tersebut fermentasi hari ke-2 dan ke-4 bakteri endofit *P. knackmussii* dan *B. siamensis* berpotensi sebagai antibakteri dengan sensitifitas rendah sedangkan fermentasi hari ke-3

berpotensi sebagai antibakteri dengan sensitifitas sedang. Gambar hasil replikasi uji aktivitas antibakteri bakteri endofit dapat dilihat dalam lampiran 12 dan 13.

Berdasarkan hasil pada gambar 12 dan 13 kurva menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri yang dihasilkan pada fermentasi hari ke-3 lebih optimal dibandingkan dengan fermentasi hari ke-2 dan ke-4. Hal ini sesuai dengan literatur yaitu Pelczar *et al.* (1986) yang menyatakan bahwa senyawa antimikroba dihasilkan oleh mikroorganisme yaitu pada fase stasioner pertumbuhannya saat populasi tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Pada fase ini, metabolit sekunder banyak diproduksi karena bakteri saling mempertahankan diri untuk bertahan hidup dengan cara mengeluarkan metabolit sekundernya. Sintesis metabolit sekunder dimulai pada saat beberapa zat gizi di dalam media pertumbuhan mikroorganisme telah habis. Hasil penelitian ini pula sejalan dengan Elita *et al.* (2013) yang menunjukkan bahwa fase stasioner dari kurva pertumbuhan bakteri jenis *Pseudomonas* pada kultur umur 72 jam (hari ke-3) memiliki aktivitas antibakteri terbesar terhadap *S. aureus*. Begitupula dengan penelitian El-Shestawy *et al.* (2015) dan Jaysree *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa fase stasioner dari kurva pertumbuhan bakteri jenis *Bacillus* yaitu pada kultur umur 72-78 jam. Namun, aktivitas antibakteri menurun pada fermentasi hari ke-4 yaitu dimana bakteri berada pada fase penurunan pertumbuhan atau kematian bakteri. Menurut penelitian Nursyam (2017) menyatakan bahwa protein atau metabolit yang berada pada fase penurunan lebih rendah dibanding fase stasioner karena fase penurunan merupakan fase dimana terjadinya peningkatan kematian sel bakteri sehingga bakteri yang masih tersisa dibiarkan hidup dalam bahan sisa metabolisme dari sel-sel bakteri yang telah mati. Maka, dapat disimpulkan bahwa ada dua kemungkinan yang mengakibatkan menurunnya aktivitas antibakteri pada hari ke-4 yaitu bakteri mengonsumsi protein atau sisa metabolit dari bakteri itu sendiri atau bakteri memproduksi metabolit yang dapat melemahkan aktivitas antibakteri.

Menurut Ryan *et al.* (2008) beberapa bakteri endofit merupakan anggota bakteri penghuni tanah, seperti *Pseudomonas* dan *Bacillus*. Genus-genus tersebut diketahui memiliki kemampuan menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat antibiotik, antikanker, antifungi, antivirus, insektisida dan immunosuppressant. Menurut Tan dan Zou (2001) mikroba endofit dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang karakternya mirip atau sama dengan inangnya. Beberapa penelitian terkait senyawa bioaktif dari bakteri endofit sama dengan inangnya yaitu penelitian Elita *et al.* (2013) menyatakan bahwa kandungan saponin dari ekstrak kasar fermentasi bakteri endofit *Pseudomonas sp* dari umbi tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Penelitian lainnya, bakteri endofit *Bacillus polymixa* yang diisolasi dari tumbuhan *Artemisia annua* memiliki kemampuan untuk memproduksi senyawa biotransformasi artemisinin sebagai senyawa bioaktif antimalaria (Simanjuntak *et al.* 2004).

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa bakteri endofit yang diisolasi dari umbi tanaman talas juga memiliki aktivitas antibakteri seperti tanaman inangnya. Penelitian terkait senyawa antibakteri dari umbi tanaman talas diantaranya: kandungan alkaloid dari ekstrak etanol umbi talas memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* dan *Vibrio cholera* (Hibai *et al.* 2015). Penelitian lainnya juga menyatakan bahwa kandungan alkaloid, flavonoid, tannin, terpenoid dan analisis GC-MS nya yaitu *decanoic acid*, *fluoro trimethyl ester* dan *pentadecanoic acid* dari ekstrak methanol umbi tanaman talas terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap 9 bakteri pathogen dengan nilai zona hambat terbesar pada *Klebsiella sp* (Abraham *et al.* 2015). Berdasarkan hal tersebut, besar kemungkinan bakteri endofit yang menetap di umbi tanaman talas memiliki kemampuan untuk mensintesis senyawa antibakteri seperti tanaman inangnya dan mentransformasi

menjadi struktur kimia yang lain oleh bakteri endofit tersebut, sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikannya.

Melalui halaman web <https://www.uniprot.org> dapat diketahui protein apa saja yang diduga sebagai senyawa antibakteri yang mampu disintesis oleh bakteri endofit *P. knackmussii* dan bakteri endofit *B. siamensis*. Uniprot adalah berisi sejumlah besar informasi tentang fungsional biologis protein atau database urutan protein yang berasal dari proyek sekuensing genom. Salah satu jenis protein yang dikenal sebagai antibakteri yang banyak disintesis oleh suatu bakteri yaitu bakteriosin. Bakteriosin adalah protein yang disintesis secara ribosomal dan bersifat bakterisidal terhadap bakteri lain yang mempunyai hubungan dekat dengan bakteri penghasilnya (Heng *et al.* 2007). Bakteriosin yang diproduksi oleh kelompok bakteri Gram negatif dikelompokkan dalam 4 kelas yaitu kolisin, *colicins like*, *phage-tail like* dan mikrosin (Chavan dan Riley 2007). Selain bakteriosin, Sumi *et al.* (2015) menyatakan terdapat tiga jenis polipeptida yang umumnya berpotensi sebagai antimikroba yang disintesis secara non ribosomal oleh bakteri *Bacillus sp* yaitu iturin, surfaktin dan fengycin.

Berdasarkan hasil pencarian, bakteri endofit *P. knackmussii* diketahui mampu mensintesis protein TonB, C-terminal dan Tol-Pal system protein TolQ yang diduga sebagai senyawa antibakteri karena melakukan proses biologis yaitu transport bakteriosin. Transport bakteriosin adalah proses pemindahan suatu molekul antimikroba yang melintasi membran plasma untuk masuk dan keluar dari sel. Sehingga diduga protein melewati membran plasma untuk keluar sel kemudian memberikan efek penghambatan terhadap bakteri patogen atau menyerang bakteri sehingga mengakibatkan bakteri menjadi lisis. Selain itu, pada laman uniprot menjelaskan bahwa protein TonB, C-terminal juga memiliki tingkat similaritas 90% dengan kolisin. Kolisin adalah protein dengan berat molekul tinggi yang dihasilkan oleh galur-galur *E. coli* dan bersifat antimikroba. Berdasarkan cara membunuh bakteri ada dua tipe kolisin yaitu kolisin pembentuk pori dan kolisin nuklease. Kolisin pembentuk pori membunuh target dengan cara

membentuk pori dalam membran sel, sedangkan kolisin nuklease membunuh target dengan berperan sebagai DNase, RNase atau tRNase (Gillor *et al.* 2004), sehingga diduga bahwa mekanisme protein TonB, C-terminal sebagai antibakteri sama dengan kolisin. Bakteri endofit *B. siamensis* diketahui mampu mensintesis bakteriosin, iturin dan surfaktin. Mekanisme aksi antibakteri dari bakteriosin sama halnya dengan kolisin yaitu pembentukan pori dalam membran sitoplasma atau penghambatan biosintesis dinding sel dan aktivitas enzim (RNase atau DNase) dalam sel target (Chotiah 2013). Mekanisme aksi antibakteri dari surfaktin yaitu sifatnya yang amfifilik membuat molekul surfaktin dapat berpenetrasi ke dalam membran sel target sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif dari membran sel bakteri dan mengakibatkan kebocoran (Carrillo *et al.* 2003). Begitupula dengan mekanisme aksi antibakteri dari iturin adalah dengan membentuk pori pada membran target yang juga akan mempengaruhi permeabilitas selektif membran sel tersebut (Michel *et al.* 1985). Membran sel bakteri berfungsi sebagai pelindung molekuler sel seperti sitoplasma dan mengatur pertukaran zat yang berada di dalam sel dengan zat yang ada di luar sel. Kerusakan membran sel akan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri seperti protein, asam nukleat, nukleotida dan garam-garam mineral lainnya yang mengakibatkan bakteri menjadi lisis. Selain itu, mekanisme aksi antibakteri lainnya adalah memiliki aktivitas enzim DNase atau RNase. Semua makhluk hidup termasuk bakteri (prokariot) melakukan proses ekspresi gen. Ekspresi gen adalah rangkaian proses penerjemahan informasi genetik dalam bentuk urutan basa pada DNA atau RNA menjadi protein. Tahapan ekspresi gen yaitu transkripsi dan translasi. Transkripsi adalah pembentukan atau sintesis RNA dari rantai DNA sedangkan translasi adalah proses penerjemahan urutan nukleotida yang ada pada mRNA menjadi protein. Oleh sebab itu, mekanisme antibakteri dengan memiliki aktivitas DNase akan menyebabkan tidak terjadinya proses transkripsi sedangkan aktivitas RNase akan menyebabkan tidak terjadinya proses translasi. Ketika proses ekspresi gen terganggu maka bakteri tidak memiliki kemampuan

diferensiasi sel dan proses metabolisme di dalam sel bakteri juga terganggu sehingga bakteri menjadi lisis. Gambar hasil pencarian protein antibakteri dari bakteri endofit dapat dilihat dalam lampiran 14 dan 15.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa zona hambat yang dihasilkan oleh bakteri endofit *P. knackmussii* lebih besar dibandingkan bakteri endofit *B. siamensis*. Zona hambat yang dihasilkan bakteri endofit *P. knackmussii* pada fermentasi hari ke-3 yaitu sebesar 9,69 mm sedangkan bakteri endofit *B. siamensis* yaitu sebesar 9,20 mm. Hal ini berkaitan dengan pertumbuhan bakteri yang baik terjadi bila kebutuhan nutrisinya tercukupi, demikian pula produksi senyawa metabolit yang dihasilkan akan lebih optimum jika nutrisi tersedia agar dapat mensekresikan senyawa bioaktifnya. Dinding sel bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan lebih tebal (40 lapisan) dibandingkan dengan dinding sel bakteri Gram negatif (1-5 lapisan) sehingga kebutuhan nutrisi pada bakteri Gram positif lebih kompleks dibandingkan dengan bakteri Gram negatif yang relatif sederhana (Lewis *et al.* 2007). Maka dengan menggunakan media fermentasi dan perlakuan yang diberikan sama, nutrisi yang diperoleh bakteri endofit *P. knackmussii* lebih besar daripada bakteri endofit *B. siamensis*. Hal inilah yang menyebabkan bakteri endofit *P. knackmussii* menghasilkan zona hambat lebih besar dibandingkan dengan bakteri endofit *B. siamensis*. Menurut Sudana (2004) tinggi atau rendahnya aktivitas antibakteri suatu senyawa dapat disebabkan oleh sifat fisik dari senyawa tersebut, dapat dilihat dari panjang rantai, kemampuan menembus dinding sel, kebutuhan molekul dalam sel serta sifat hidrofilik atau lipofiliknya.

Hasil uji aktivitas antibakteri bakteri endofit *P. knackmussii* dan *B. siamensis* terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 juga dianalisis dengan menggunakan SPSS 21. Uji statistik Kolmogorov Smirnov (KS) bertujuan untuk mengetahui normalitas data. Berdasarkan uji KS diperoleh nilai $p = 0,977 > \alpha$ (0,05) pada bakteri endofit *P. knackmussii* dan $p = 0,728 > \alpha$ (0,05) pada bakteri endofit *B. siamensis*, sehingga data tersebut menunjukkan distribusi normal.

Setelah data dinyatakan terdistribusi normal, selanjutnya dilakukan uji *Levene* untuk mengetahui homogenitas varian data. Berdasarkan uji *Levene* diperoleh nilai $p = 0,532 > \alpha (0,05)$ pada bakteri endofit *P. knackmussii* dan $p = 0,308 > \alpha (0,05)$ pada bakteri endofit *B. siamensis*, yang menunjukkan data tersebut homogen. Data kemudian diolah dengan *One Way Anova* pada uji *Least Significant Difference* (LSD) untuk mengetahui perbedaan pada masing-masing fermentasi hari ke-2, ke-3 dan ke-4 dari bakteri endofit dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Berdasarkan uji LSD, fermentasi bakteri endofit *P. knackmussii* hari ke-2 dan ke-3 diperoleh nilai $p = 0,022 > \alpha (0,05)$, fermentasi hari ke-2 dan ke-4 diperoleh nilai $p = 0,005 > \alpha (0,05)$ dan fermentasi hari ke-3 dan ke-4 diperoleh nilai $p = 0,000 > \alpha (0,05)$, sehingga data tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara fermentasi hari ke-2, ke-3 dan ke-4 dari bakteri endofit *P. knackmussi* dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Begitupula fermentasi bakteri endofit *B. siamensis* hari ke-2 dan ke-3 diperoleh nilai $p = 0,000 > \alpha (0,05)$, fermentasi hari ke-2 dan ke-4 diperoleh nilai $p = 0,000 > \alpha (0,05)$ dan fermentasi hari ke-3 dan ke-4 diperoleh nilai $p = 0,015 > \alpha (0,05)$, sehingga data tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara fermentasi hari ke-2, ke-3 dan ke-4 dari bakteri endofit *B. siamensis*. Terakhir, data diolah dengan uji *Duncan* untuk mengetahui jenis terbaik berdasarkan rankingnya. Berdasarkan uji *Duncan*, hasil fermentasi bakteri endofit *P. knackmussii* dan *B. siamensis* pada hari ke-2, ke-3 dan ke-4 berada pada subset yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dan nilai optimal diperoleh pada fermentasi hari ke-3. Hasil data analisis daya aktivitas antibakteri dapat dilihat pada lampiran 16 dan 17.