

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT DARI DAUN DAN
KULIT BATANG TANAMAN LELAK (*Uvaria rufa* Blume)
SEBAGAI ZAT ANTIBAKTERI**

SKRIPSI



**UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A**

Disusun Oleh:

**IKA ISNAYANTI
H01216010**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL
SURABAYA
2020**

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

NAMA : IKA ISNAYANTI

NIM : H01216010

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2016

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul: "ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT DARI DAUN DAN KULIT BATANG TANAMAN LELAK (*UVARIA RUF A* BLUME) SEBAGAI ZAT ANTIBAKTERI". Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 07 Agustus 2020

Yang menyatakan,



(Ika Isnayanti)
NIM H01216010

LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi oleh:

NAMA : IKA ISNAYANTI

NIM : H01216010

JUDUL : Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Daun dan Kulit Batang Tanaman Lelak (*Uvaria rufa* Blume) Sebagai Zat Antibakteri

Telah diperiksa dan disetujui untuk diujikan.

Surabaya, 27 Juli 2020

Dosen Pembimbing 1



Eva Agustina, M.Si
NIP. 198908302014032008

Dosen Pembimbing 2



Dr. Moch. Irfan Hadi, S.KM., M.KL
NIP. 198604242014031003

PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Ika Isnayanti ini telah dipertahankan
di depan tim penguji skripsi
di Surabaya, 06 Agustus 2020

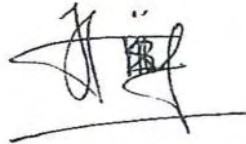
Mengesahkan,
Dewan Penguji

Penguji I



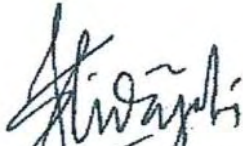
Eva Agustina, M.Si
NIP. 198908302014032008

Penguji II



Dr. Moch. Irfan Hadi, S.KM., M.KL
NIP. 198604242014031003

Penguji III



Sri Hidayati L, SKM, M.Kes
NIP. 198201252014032001

Penguji IV




Drs. Abdul Manan, M.Pd.I
NIP. 197006101998031002

Mengetahui,

Plt. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN-Sunan Ampel Surabaya




Dr. Hj. Evi Fatimatur Rusydiyah, M.Ag
NIP. 197312272005012003



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300
E-Mail: perpustakaan@uinsby.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : IKA ISNAYANTI
NIM : H01216010
Fakultas/Jurusan : SAINS DAN TEKNOLOGI/BIOLOGI
E-mail address : yanti.gresikoi.07@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

Sekripsi Tesis Desertasi Lain-lain (.....)
yang berjudul :

ISOLASI DAN IDENIFIKASI BAKTERI ENDOFIT DARI DAUN DAN KULIT BATANG
TANAMAN LELAK (*Uvaria rufa* Blume) SEBAGAI ZAT ANTIBAKTERI

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara *fulltext* untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 7 Agustus 2020

Penulis


(Ika Isnayanti)

tumbuhan yang bermacam-macam”. Pada ayat ini dengan kekuasaan-Nya segala apa yang ada di bumi telah diatur sebagaimana mestinya sebagai nikmat untuk memelihara kehidupan hamba-Nya. Semua kebutuhan telah disiapkan termasuk tumbuhan yang beragam baik dari segi warna, rasa dan manfaatnya.

Bakteri endofit merupakan bakteri yang dapat diisolasi dari organ tanaman karena bakteri ini hidup berasosiasi di dalam jaringan tanaman inangnya (Bhore dan Sathisha 2010). Keberadaan bakteri tidak menjadikan tanaman terkena penyakit, melainkan memberi pertahanan untuk melawan patogen seperti infeksi jamur dan mikroorganisme lainnya melalui kandungan metabolit sekunder yang diproduksi. Menurut Strobel (2003) terjadi interaksi transfer materi genetik pada mikroba dan tanaman inangnya, sehingga senyawa bioktif yang diproduksi tanaman inang, juga diproduksi oleh mikroba. Bakteri endofit dapat diekstrak untuk diambil senyawa bioaktif metabolit sekundernya melalui isolasi organ tanaman dan pembiakan isolat pada media pertumbuhan.

Menurut Pelczar dan Chan (2008) menyatakan bahwa bakteri dapat diisolasi dari lingkungan dan dibiakkan pada media pertumbuhan yang sesuai dapat berkembang biak dalam jumlah yang banyak pada waktu yang singkat. Hal tersebut menjadi potensi yang baik dalam pengembangan sumber obat baru tanpa melakukan eksploitasi alam. Selain itu pertumbuhan mikroba yang cepat dan banyak dapat digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder

Saat ini telah banyak penelitian isolasi bakteri endofit pada tanaman tertentu untuk mendapatkan ekstrak metabolit sekunder yang digunakan sebagai zat antibakteri pada beberapa bakteri patogen. Priharta (2008), melakukan isolasi pada batang tanaman *Artemisia annua*, ditemukan isolat bakteri *Amphibacillus* sp. yang diekstrak metabolit sekundernya untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen *E. coli*. Selanjutnya penelitian Kusumawati dkk (2014), menggunakan akar, batang dan daun tanaman miana (*Coleus scutellariodes* L. Benth), didapatkan 22 isolat bakteri, yang selanjutnya dilakukan ekstraksi untuk pengujian terhadap patogen *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*, hasilnya ada 13 isolat yang mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* dan 15 isolat yang mampu menghambat *S. aureus*. Serta pada Purwanto dkk, (2014), melakukan isolasi pada bagian daun, batang dan akar tanaman sirih hijau (*Piper betle* L.), diperoleh 19 isolat, selanjutnya ekstrak isolat dilakukan uji antibakteri pada 4 bakteri patogen diantaranya *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* dan *Salmonella enteritidis*, hasilnya terdapat 3 isolat ekstrak yang mampu menghambat pertumbuhan 4 bakteri patogen tersebut. Kesimpulan pada beberapa penelitian diatas menunjukkan bakteri endofit hidup pada tanaman yang berpembuluh. Hal tersebut sesuai dengan Strobel (2002), yang menyatakan hampir setiap tumbuhan tingkat tinggi mengandung beberapa bakteri endofit tertentu yang masuk melalui akar, stomata, atau bagian luka pada tumbuhan. Hal tersebut dilakukan sebagai upaya pencarian obat baru untuk mengatasi resistensi antibiotik secara tepat guna.

Menurut Sumampouw (2018) pada penelitiannya melakukan uji sensitivitas beberapa antibiotik terhadap bakteri *E.coli* penyebab diare pada balita, hasilnya bakteri *E. coli* memiliki kemampuan resisten pada konsentrasi sebesar 0,001 ppm terhadap antibiotik *amoxicillin*, *ampicillin*, *chloramphenicol*, dan *tetracyclin*. Terjadinya resistensi ini perlu adanya upaya seperti pengembangan zat antimikroba baru dari bahan alam untuk mengatasinya.

Tanaman genus *Uvaria* merupakan spesies famili Annonaceae yang berhabitus liana dan tergolong tanaman tingkat tinggi. Karakter utama pada genus ini adalah adanya bulu pada permukaan organ tanaman berbentuk bulu bintang (*Stellate hair*). Tanaman ini memiliki beberapa spesies meliputi *Uvaria purpurea*, *Uvaria micrantha*, *Uvaria rufa*, *Uvaria littoralis*, *Uvaria grandiflora*, *Uvaria concava*, *Uvaria schizocalyx*, *Uvaria scheffleri*, *Uvaria chamae*, *Uvaria microcarpa* dan jenis lainnya.

Pada penelitian Macabeo et.al, (2012), daun *Uvaria rufa* mengandung senyawa metabolit sekunder seperti Flavonoid, steroid dan terpenoid serta senyawa polar lainnya seperti senyawa aromatik laktone, asetilenin dan alkaloid, yang selanjutnya pada senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antituberkulosis. Daun tanaman ini di spesies *Uvaria grandiflora* dan *Uvaria microcarpa* juga mengandung minyak esensial yang mengandung α -Pinene, Sabinene, Myrcene, α -Phellandrene, α -Terpinene, o-Cymene, Limonene, Benzyl alcohol, Cineole, β -Ocimene, γ -Terpinene, α -Terpinolene, Citral, Chavicol, Eugenol, α -Copaene, β -Elemene, β -Caryophyllene, Germacrene,

Phenylpropanoids dan lainnya (Thang et.al, 2017). Melalui penelitian tersebut, menyatakan bahwa pada daun tanaman beberapa spesies *Uvaria* mengandung senyawa metabolit sekunder yang berbeda.

Kandungan senyawa bioaktif pada akar tanaman di beberapa spesies telah diteliti oleh Nkunya et.al (2003) melakukan ekstraksi pada kulit akar tanaman *Uvaria scheffleri*, hasilnya terdapat kandungan metabolit sekunder seperti trimerik monoterpen yang termasuk golongan terpenoid. Koudokpon et.al (2018), melakukan ekstraksi pada akar *Uvaria chamae* yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan patogen yang resisten terhadap antibiotik seperti VRE dan MRSA, hasilnya pada ekstrak mengandung senyawa uvaretin, dan chamanetin yang dapat digunakan sebagai obat. Pada penelitian tersebut, menyatakan bahwa pada organ akar tanaman di beberapa spesies *Uvaria* mengandung senyawa metabolit sekunder yang berbeda.

Pada tanaman *Uvaria* ini telah dilakukan isolasi jamur endofit pada spesies *Uvaria microcarpa* dengan mengamati struktur mikroskopisnya yaitu pada bagian batang ditemukan pada jaringan floem sekunder dan korteks, sedangkan pada bagian daun ditemukan pada jaringan epidermis, mesofil dan pembuluh (Zhu et.al, 2009). Pada penelitian Hoa-hua et.al (2016), melakukan analisis senyawa bioaktif pada jamur endofit *Arthrimum* sp. A092 dari *Uvaria microcarpa* yang selanjutnya dilakukan uji sitotoksisitas pada sel kanker dan didapatkan 10 senyawa bioaktif yaitu hydroxyisocoumarin, decarboxycitrinone, 4-hydroxy-17R-methylincisterol, 4- asam hidroksi-3-metoksibenzoat, dibutil ftalat, asam flemingipanik, asam indol-3-karboksi,

Menurut klasifikasi tersebut tanaman ini tergolong pada kelompok tanaman berpembuluh, dan memiliki biji yang diselubungi struktur kulit buahnya serta biji berkeping ganda. Secara umum karakter utama yang dimiliki oleh Famili Annonaceae dengan suku lainnya, pada organ vegetatif tanaman memiliki daun dengan pertulangan menyirip yang tersusun secara berseling tanpa stipula, memiliki kulit pada batang atau ranting muda yang berserat sehingga apabila dikelupas akan meninggalkan robekan yang sulit terputus, pada anatomi melintang batang terdapat pola kambium yang membentuk putaran roda. Sedangkan pada organ generatif bunga terletak pada ujung daun, sebagian besar berada di ketiak daun dan posisinya berlawanan dengan tangkai daun dengan kelopak (*sepal*) berjumlah 3, bebas dan bentuk *connate* secara bervariasi, mahkota (*petal*) berjumlah 3 yang tersusun dalam 2 rangkaian lingkaran yaitu *outer* dan *inner* secara apikal yang berbentuk seperti perisai. (Lestari, 2017). Engler dan Prantl mengklasifikasikan Annonaceae dalam kelas dikotil yang primitif dan tergabung dalam sub kelas *Dialypetale* dengan jumlah bagian bunga yang tidak terbatas dan benang sari yang tersusun spiral. Sistem pengelompokan Engler dan Prantl berdasarkan tingkat evolusinya dengan konsep bunga primitif (unisexual *achlamydeous*) (Lestari, 2017).

dalam genus seperti *Uvaria* (Lestari, 2017). Sedangkan pada Attanayake dkk (2011), menyatakan bahwa *Uvaria* adalah salah satu genus paleotropika terbesar di Annonaceae.

2.2 Bakteri Endofit

Bakteri endofit merupakan bakteri yang dapat diisolasi dari organ tumbuhan karena bakteri ini hidup berasosiasi di dalam jaringan tumbuhan inangnya (Bhore dan Sathisha 2010). Keberadaan bakteri tidak menjadikan tumbuhan terkena penyakit, melainkan memberi pertahanan untuk melawan patogen seperti infeksi jamur dan mikroorganisme lainnya melalui kandungan metabolit sekunder yang diproduksi. Seperti yang telah dilakukan Melliawati dkk, (2006) melakukan uji coba bakteri endofit penghasil senyawa bioaktif untuk proteksi tanaman pada mikroba patogen seperti *P. solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas solanacearum*, *Colletotricum gloeosporioides* dan *Fusarium oxysporum*. Mikroba endofit baik bakteri maupun kapang melakukan serangkaian interaksi materi genetik dengan tanaman dan menghasilkan senyawa bioaktif yang mirip dengan inangnya salah satunya metabolit sekunder yang selanjutnya dapat dimanfaatkan sebagai obat seperti, antibakteri (Wilson dkk, 2017), antifungi (Lestari dkk, 2017), antioksidan penghasil hormon pertumbuhan (Junaedi, 2017) dan antiviral (Strobel and Bryn, 2003). Jenis mikroba endofit, asal isolat mikroba endofit dan kondisi perakaran tanaman inang berpengaruh terhadap senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan (Carrol, 1998 dalam Melliawati dan Sufinah, 2017).

Tabel. 2.1 Jenis Bakteri Endofit yang Telah Diisolasi dari Beberapa Tumbuhan

Tanaman	Bakteri Endofit yang diisolasi	Prosedur	Pustaka
kulit batang <i>Annona squamosa</i>	<i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus latesporus</i> <i>Virgibacillus pantothenicus</i> dan <i>Bacillus circulans.</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Isolasi bagian tanaman pada media TSA dan NA. 2. Uji antimikroba metode difusi sumuran pada patogen <i>Staphyococcus aureus</i>, <i>Bacillus cereus</i> dan <i>E. coli</i> dengan ekstrak cair pada konsentrasi maksimum. 3. Idetifikasi secara morfologis dan biokimia pada bakteri yang memiliki aktivitas akntimikroba. 	Zulkifli (2018)
Batang <i>Artemisia annua</i>	<i>Amphibacillus</i> sp.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Isolasi bagian tanaman pada media MS 2. Uji antimikroba pada patogen <i>S. aureus</i> metode difusi kertas cakram 3. Idetifikasi secara genetik 	Priharta (2008)
Rumput Kebar (<i>Biophytum</i> sp.)	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> dan <i>Enterobacter gergoviae.</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Isolasi bagian tanaman pada media NA 2. Uji antimikroba pada patogen <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i> metode difusi kertas cakram 3. Idetifikasi isolat melalui microbact 12 	Fitriyah (2015)
Daun, bunga, batang dan akar Jeringau (<i>Acorus calamus</i> L.)	<i>Enterobacter</i> sp. dan <i>Pseudomonas</i> sp. strain RR021	<ol style="list-style-type: none"> 1. Isolasi bagian tanaman pada media NA 2. Ekstraksi isolat metode maserasi pada pelarut methanol, etil asetat dan N-Hekasan 3. Skrining fitokimia secara kualitatif 4. Uji antimikroba pada patogen <i>Candida albicans</i>, <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i> metode difusi kertas cakram 5. Idetifikasi isolat secara genetik. 	Hutagalung (2018)

Dari tabel 2.1 diketahui jika setiap tanaman memiliki jenis mikroba endofit yang berbeda. Hampir setiap tumbuhan tingkat tinggi mengandung beberapa bakteri endofit tertentu yang masuk melalui akar, stomata, atau bagian luka pada tumbuhan dan membentuk koloni dalam jaringan tumbuhan baik pada

usus besar manusia bakteri ini membantu dalam proses pembusukan makanan serta memproduksi vit K untuk proses pembekuan darah serta menjadi penghalang tumbuhnya bakteri lain yang dapat berbahaya jika terdapat di usus. Sifat patogen pada bakteri ini dapat menyebabkan diare dan infeksi pada organ tubuh lain seperti saluran kencing. Hal ini dapat terjadi jika pertumbuhannya tidak terkendali. Bakteri ini dapat ditemukan pada lingkungan yang tercemar seperti pada tanah dan air yang terkontaminasi oleh tinja dan tidak jarang dapat ditemukan pada produk makanan dan minuman yang belum matang untuk dikonsumsi (Winarni, 2013). Berikut merupakan Klasifikasi bakteri menurut Sutiknowati (2016) :

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Eubacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

Berdasarkan Ramadhan, (2009) *E. coli* terbagi dalam banyak serotip yang setiap serotip dapat menyebabkan penyakit dengan mekanisme dan tingkat keparahan yang berbeda. Berdasarkan hal tersebut pengelompokan bakteri ini terbagi dalam 5 kelompok:

- a. *E. coli* Enteropatogenik (EPEC) merupakan penyebab diare pada bayi dengan cara melekat pada sel mukosa usus kecil. Infeksi EPEC adalah diare dengan feses encer yang mengandung mucus tapi tidak berdarah.
- b. *E. coli* Enterotoksigenik (ETEC) menjadi penyebab diare pada manusia dan hewan terutama di negara berkembang. ETEC dapat ditemui pada daerah lambung, usus kecil dan besar saat terjadi infeksi, yaitu dengan memproduksi enterotoksin yang menyebabkan sekresi air pada usus sehingga feses yang dikeluarkan biasanya diikuti oleh darah kering dari dinding mukosa usus.
- c. *E. coli* Enteroinvasif (EIEC) menjadi penyebab diare pada anak-anak dan wisatawan yang menuju Negara tersebut dan tidak dapat melakukan fermentasi laktosa dengan cepat dan tidak dapat bergerak.
- d. *E. coli* Enterohemoragik (EHEC) pada kelompok ini bakteri menghasilkan verotoksin yang menyebabkan terjadinya diare berdarah. Reservoir utama EHEC adalah dari kotoran yang dikeluarkan oleh hewan pemamah biak seperti sapi, kambing, domba dan rusa.
- e. *E. coli* Enteroagregatif (EAEC) pada kelompok ini bakteri dapat menyebabkan diare akut dan kronik dimana banyak dijumpai pada masyarakat di negara berkembang.

Selain itu menurut Sutiknowati (2016), bakteri ini tidak dapat dibunuh melalui proses pendinginan maupun pembekuan, melainkan melalui pemberian antibiotik, paparan sinar UV dan pemanasan pada suhu $>100^{\circ}\text{C}$. Bakteri ini dapat mencerna asam organik seperti asetat dan garam anorganik

seperti ammonium sulfat sebagai sumber nutrisi karbon dan nitrogen, serta tidak dapat mencerna karbohidrat rantai panjang sebagai nutrisinya. Pada bidang teknologi dan kesehatan bakteri ini juga sering dimanfaatkan dalam bidang rekayasa genetika dan bioteknologi sebagai vektor untuk penyisipan gen tertentu yang selanjutnya akan dibiakkan, karena memiliki struktur genetika yang sederhana sehingga mudah direkayasa serta pertumbuhannya cepat. Pada penelitian Sumampouw, (2018) melakukan uji sensitivitas pada beberapa antibiotik seperti *Chloramphenicol*, *Ciproflaxin*, *Amoxiciliin*, *Ampicillin*, dan *Tetracyclin* terhadap bakteri *E. coli* dan hasilnya antibiotik *Ciproflaxin* menjadi antibakteri yang paling baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri ini, sehingga direkomendasikan dalam pengobatan diare pada balita. Sedangkan ada beberapa penelitian mengenai peran bakteri endofit yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* seperti pada Zulkifli, dkk (2018), mengisolasi kulit batang srikaya, Priharta (2008), mengisolasi bakteri endofit pada tumbuhan *Artemisia annua.*, pada tahun 2014, Kusumawati mengisolasi bakteri endofit pada tumbuhan Miana sedangkan Purwanto pada tumbuhan sirih hijau.

2.4 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan senyawa yang diproduksi oleh beberapa flora, fauna invertebrata maupun mikroorganisme dengan beragam manfaat seperti antibakteri, antijamur, antioksidan dan lainnya, dimana zat tersebut tidak digunakan dalam pertumbuhan dan perkembangan flora atau fauna tersebut.

Setiap spesies memiliki potensi produksi senyawa yang memiliki karakteristik tertentu. Metabolit sekunder disebut sebagai fitoaksin yaitu senyawa dengan berat molekul rendah yang memiliki sifat antimikroba atau antiparasit (Khotimah, 2016). Menurut Silvia, (2018) Jenis metabolit sekunder meliputi:

- a. Flavonoid yaitu senyawa yang disintesis dari asam piruvat melalui metabolisme asam amino, fungsinya adalah untuk mendenaturasi protein sehingga menurunkan permeabilitas membran sel, transport nutrisi dalam sel terganggu dan sel mati.
- b. Alkaloid yaitu senyawa yang paling sedikit mengandung satu atom nitrogen yang bersifat basa dan membentuk cincin heterosiklik. Senyawa ini berfungsi untuk penghambatan proses sintesis dinding sel, sehingga sel lisis.
- c. Fenol yaitu senyawa teroksidasi yang diperoleh dari reaksi dengan gugus sulfhidril, fungsinya adalah untuk penyebab gangguan pada integritas membran sel dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme.
- d. Terpenoid yaitu senyawa yang tersusun atas isoprene, dimana terdiri dari beberapa senyawa yaitu, monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap, diterpen yang sukar menguap dan triterpen dan sterol yang tidak menguap serta bersifat toksik pada sel yang abnormal.

Uji biokimia berhubungan erat dengan karakterisasi berdasarkan reaksi metabolisme sel bakteri, uji ini perlu untuk dilakukan karena bertujuan untuk meminimalkan kesalahan, karena bisa jadi beberapa spesies bakteri memiliki karakter morfologis yang hampir sama. Mikroba yang memiliki karakter morfologis yang sama, masih memungkinkan untuk berbeda dalam kebutuhan nutrisi dan kondisi ekologiannya. Hubungan antara biokimia dan metabolisme sel adalah terjadinya reaksi kimia pada sel mikroba, bahwa mikroba tersebut dapat menghasilkan energi dari sumber karbon atau menggunakan energi untuk sintesis komponen penyusun sel serta sebagai pengatur kegiatan selulernya. Sifat metabolisme bakteri diamati melalui interaksi metabolit yang dihasilkan dengan reagen kimia yang tidak lain adalah sumber karbon (Priharta, 2008). Pada penelitian Zulkifli (2018), uji biokimia yang dilakukan untuk identifikasi bakteri endofit pada kulit batang tanaman srikaya famili Annonaceae adalah Uji Katalase, Uji Motilitas, Uji MR-VP (Methyl red-Voges proskauer), Uji Indol, Uji Fermentasi Gula, Uji Sitrat, Uji Urease, Uji Ketahanan garam dan Hidrolisis pati. Berikut merupakan jenis uji biokimia dan tujuannya berdasarkan (Rohmah,2017):

- a. Uji katalase bertujuan untuk mengetahui bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase.
- b. Uji indol bertujuan untuk mengetahui keberadaan enzim triptophanase yang berfungsi sebagai oksidase asam amino untuk membentuk indol sebagai sumber karbon.

dibagi menjadi bakteriosida (bahan yang membunuh bakteri tapi tidak menyebabkan lisis pada bakteri) dan bakteriostatik (bahan yang hanya menghambat pertumbuhan bakteri dan tidak menyebabkan kematian pada bakteri). Senyawa antibakteri biasa dikenal dengan sebutan antibiotik, dimana mekanisme antibiotik terhadap bakteri meliputi: merusak dinding sel bakteri dengan menghambat pembentukan atau mengubahnya setelah dibentuk, perubahan permeabilitas membran plasma sehingga sel mengalami lisis, perubahan dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein, menghambat metabolisme bakteri dengan mengganggu kerja enzim (Pelczar dan Chan, 2008).

Antibakteri dapat berasal dari bahan kimia maupun bahan alam yang mengandung senyawa bioaktif seperti metabolit sekunder. Pengujian senyawa antibakteri penting untuk dilakukan sebagai data untuk mengetahui potensi atau keefektifan suatu senyawa antibakteri terhadap bakteri uji maupun kepekaan bakteri uji saat pemberian senyawa antimikroba pada dosis tertentu. uji antimikroba secara *in vitro* dapat dilakukan melalui metode difusi dan metode dilusi. Menurut Nurhayati (2011), antibiotik ideal memiliki sifat seperti:

1. Mampu untuk mematikan atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme secara luas.
2. Tidak menimbulkan terjadinya resistensi dari mikroba patogen.
3. Tidak memberikan efek samping pada inangnya.

4.3 Alat dan Bahan

a. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang dan daun tanaman Lelak (*Uvaria rufa* Blume) yang diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, bakteri *Escherichia coli* yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Universitas Airlangga, media NA (*Nutrient Agar*), media NB (*Nutrient Broth*), media MHA, media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), media *Strach Agar*, media MIO, media MRS broth (media *de man rogosa sharpe broth*), media SCA (*Simmon's citrate agar*), media MR-VP (methyl red dan voges proskeuer), media urea, Glukosa, laktosa, maltosa, mannitol, sukrosa, Pewarna kristal violet dan safranin, larutan iodine, alkohol, paper disk, antibiotik *ciprofloxacin*, antibiotik ketokenazol, *Sodium hypochlorite*, pelarut metanol, pelarut DMSO, *hydrogen peroxide* (H_2O_2), pereaksi wagner, reagen *phenol red*, NaCl 0.9%, 5%, 6.5% dan 10%, *peptone water*, reagen kovac, reagen metil red, alfa naftol, $FeCl_3$, NaOH 20%, H_2SO_4 , $BaCl_2$, HCL, kloroform, KOH, aquades, plastik tahan panas, kapas, spirtus dan plastik wrap.

b. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, LAF (*Laminar Air Flow*), Inkubator, Vortex mixer, neraca analitik, sentrifuge, oven, rotary evaporator, hot plate, spektrovotometer Uv-Vis, Shaker Water bath, mikroskop, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas ukur, pipet tetes, pipet volume, pinset, mikropipet,

Tabel 5.4 Hasil Uji Biokimia Bakteri Endofit Tanaman *Uvaria rufa*

Biokimia	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolat 5	Isolat 6	Isolat 7	Isolat 8
MR	-	+	+	-	-	-	+	+
VP	+	-	-	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
motilitas	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-
ornithin	+	-	-	+	+	+	+	-
Hidrolisis pati	+	+	+	+	-	-	+	+
TSIA	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	A	K/A	K/A
H ₂ S	-	+	-	-	-	-	-	-
Nacl 5 %	-	-	-	+	-	-	-	-
Nacl 6.5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
Nacl 10 %	-	-	-	-	-	-	-	-
sitrat	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentasi								
glukosa	-	-	+	-	+	-	-	+
sukrosa	-	-	+	-	-	-	-	-
Laktosa	-	-	-	-	-	-	-	-
maltosa	+	+	-	-	+	-	-	+
mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-

(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020)

Karakteristik fisiologis mikroorganisme dapat diketahui dengan melakukan beberapa uji biokimia untuk mempelajari aktivitas metabolisme dan reaksi enzimatik melalui interaksi zat metabolit yang diproduksi dengan reagen kimia. Sehingga diketahui kemampuan suatu mikroorganisme dalam menggunakan senyawa sebagai sumber energi yang digunakan dalam pertumbuhannya. Pada uji MR (*methyl red*) terdapat empat isolat yang positif yaitu isolat 3, 2, 7 dan 8. Hasil positif pada uji ini yaitu dengan berubahnya media menjadi merah setelah penambahan indikator *methyl red*. Hal ini menandakan bahwa bakteri tersebut mampu mengakumulasi asam-asam campuran seperti asam format, laktat, suksinat, yang bercampur dengan CO₂, H₂ dan etanol sebagai produk akhir dari

fermentasi gula sehingga pH media turun menjadi $<5,0$ dan berwarna merah (Safitri, 2019). Sedangkan pada uji VP (Voges-Proskauer) terdapat enam isolat yang positif yaitu isolat 1,4,5,6,7 dan 8 dengan berubahnya media menjadi merah setelah penambahan reagen α -naftol 5 % dan KOH 40 %. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memproduksi 2,3 butanadiol dari fermentasi gula, penambahan KOH akan merubah asetonin menjadi diasetil dan reagen α -naftol mengkatalis reaksi sehingga media berwarna merah (Putri, 2016).

Pada penelitian ini semua isolat hasilnya positif terhadap uji urease dan katalase. Uji urease positif yang ditandai dengan perubahan media dari orange menjadi pink. Hal ini menunjukkan bahwasannya bakteri tersebut mampu menguraikan urea ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) menjadi ammonia (NH_3) dan karbonat. Sehingga dengan adanya enzim urease ini atau amidohidrolase akan memudahkan mikroorganisme dalam menggunakan urea sebagai sumber nitrogen dan energi (Collins dan D'Orazio, 1993, Mobley et al., 1995 dalam Safitri, 2019). Selanjutnya uji katalase, hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung saat pemberian *hydrogen peroksida* (H_2O_2) 3% pada isolat bakteri. Adanya aktivitas enzim katalase ini berfungsi untuk mengkatalis suatu pertahanan saat bakteri berada pada lingkungan aerob, dimana beberapa bakteri memproduksi zat toksik yang dapat menghancurkan organel selnya, seperti *hydrogen peroksida* (H_2O_2) dan *superoksida* (O_2^-) dari hasil metabolismenya sendiri, sehingga zat tersebut

harus diuraikan dengan memproduksi oksigen agar tetap hidup pada lingkungan aerob (Pattuju dkk, 2014).

Uji MIO (*Motility Indole Ornithin*), pada uji ini bakteri diinokulasikan pada media semi solid, yang digunakan untuk mendeteksi pergerakan bakteri, produksi indol dan dekarboksilasi ornithin. Pada penelitian ini semua isolat bakteri tidak motil, bakteri hanya tumbuh pada alur goresan jarum inokulum, sehingga diduga tidak memiliki flagella sebagai alat gerak. Selanjutnya pada uji indol semua isolat menunjukkan reaksi negatif, dengan tidak adanya pembentukan cincin merah setelah pemberian reagen kovac. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak menghasilkan enzim tryptophanase yang mendegradasi makromolekul asam amino tryptophan menjadi asam piruvat, ammonia dan indol. Sedangkan hasil pada uji dekarboksilase ornithin menunjukkan ada lima isolat yang positif yaitu 1,4,5,6 dan 7. Hasil positif ini ditandai dengan medium berwarna ungu, yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu menguraikan gugus karboksil dari ornithin. Enzim dekarboksilase ini memisahkan gugus karboksil untuk menghasilkan karbondioksida. Sehingga mampu memecah berbagai protein untuk sintesis sel dan sumber energi (Anggarini, 2016).

Uji hidrolisis pati pada penelitian ini ada enam isolat yang menunjukkan respon positif yakni dengan terbentuknya zona bening setelah pemberian lughol pada daerah sekitar isolat. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu menghidrolisis pati yang merupakan senyawa polisakarida dengan berat molekul tinggi sebagai sumber energi (Putri,

2017). Selanjutnya uji sitrat, yakni semua isolat menunjukkan respon negatif, dengan tidak berubahnya media dari hijau menjadi biru. Hal ini menunjukkan bahwa semua isolat bakteri tersebut tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon dan senyawa pemula untuk mendapatkan energi untuk sintesis sel. Sehingga semua isolat tidak memiliki enzim sitrat permiase untuk membawa sitrat ke dalam sel. Pada media SCA ini terdapat indikator pH yakni *bromthynol blue*, hasil negatif maka pH media tetap karena asam tidak terurai dan media tetap berwarna hijau (Anggarini, 2016).

Uji TSIA selain digunakan untuk mendeteksi fermentasi karbohidrat (glukosa, sukrosa dan laktosa) dalam memproduksi asam juga sebagai pengamatan pembentukan H₂S dan gas oleh bakteri. Semua isolat bakteri tidak menghasilkan gas karena tidak terangkat atau pecahnya media saat proses fermentasi berlangsung. Kemudian pada produksi H₂S, hanya isolat 2 yang memiliki kemampuan dalam mereduksi asam amino yang mengandung sulfur. Pada isolat 2 ini bakteri menghasilkan desulfurase dengan produk akhir senyawa FeS yang berwarna hitam. Kemudian untuk fermentasi karbohidrat ditandai dengan berubahnya daerah lereng dan dasar media menjadi berwarna kuning. Pada penelitian ini isolat 6 tidak mengalami perubahan media menjadi kuning, sedangkan isolat lainnya terjadi perubahan media menjadi kuning pada bagian dasarnya saja, artinya bakteri tersebut dapat mendegradasi dan memfermentasikan karbohidrat berupa glukosa yang disertai produksi asam. Pada media uji TSIA ini bagian lereng bersifat aerob dan bagian dasar media bersifat anaerob.

Kemudian adanya indikator fenol red pada media sebagai indikator pH, maka jika media berubah menjadi berwarna kuning pH media di bawah 6.8 sedangkan jika media tetap berwarna merah maka nilai pH nya adalah 7.4 (Putri, 2016).

Uji fermentasi karbohidrat sebagai penentu uji jenis gula yang digunakan dalam mendapatkan energi. Pada proses ini terjadi reaksi oksidasi karbohidrat sebagai substratnya sebagai sumber karbon dan energi. Selanjutnya pada penelitian ini menggunakan 5 jenis gula yakni glukosa, laktosa, manitol, maltose dan sukrosa. Menurut Putri (2016), fermentasi gula jenis glukosa bisa langsung masuk jalur fermentasi tahap pertama sedangkan untuk jenis gula lainnya harus dihidrolisis terlebih dahulu agar menjadi monosakarida penyusunnya. Laktosa menjadi galaktosa dan glukosa, maltose menjadi dua molekul glukosa, manitol menjadi manosa atau galaktosa, serta sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Hasil positif pada uji ini maka terjadi perubahan warna media dari merah menjadi kuning serta ada atau tidaknya gas pada tabung durham. Pada penelitian ini tidak ada pembentukan gas pada proses fermentasi, untuk hasil dari uji fermentasi gula ini dapat diamati pada tabel 5.4. Pada proses ini setiap bakteri memiliki jalur metabolisme yang berbeda-beda. Sedangkan uji ketahanan garam pada media NaCl konsentrasi 5%, 6.5 % dan 10 %, hal ini bertujuan untuk untuk mengetahui sifat fisiologi dari mikroba dengan mengamati pertumbuhan mikroba apabila media berubah menjadi keruh. Pada penelitian ini hanya pada isolat 4 yang menunjukkan

Berdasarkan tabel 5.5 Genus *Bacillus* memiliki karakteristik bentuk sel batang, hasil pewarnaan termasuk kelompok gram positif dan menghasilkan spora, serta hasil uji katalase menunjukkan positif merupakan ciri yang mudah untuk identifikasi pada tingkat Genus, namun untuk identifikasi pada tingkat spesies selain melalui uji biokimia, bentuk dan tata letak endospora perlu dilakukan skrining secara molekular. Hal ini sesuai dengan Fadilah dkk (2016), yang menyatakan bahwa pengelompokan bakteri bacil gram positif terdiri dari bakteri pembentuk spora (spesies *Bacillus*, *Clostridium*), dan apabila tidak membentuk spora tergolong kelompok (*Listeria*, *Erysipelothrix*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*), kemudian dibuktikan dengan hasil uji katalase positif merupakan spesies bacillus, sedangkan bakteri bacil tidak membentuk spora dengan uji katalase positif merupakan bakteri *Corynebacterium* sp.

Genus *Bacillus* termasuk satu dari enam bakteri yang menghasilkan endospora. Endospora memiliki ukuran dan bentuk yang berbeda sehingga data digunakan sebagai kunci identifikasi spesies pada kelompok genus ini. Berdasarkan letaknya endospora berada di tengah sel, ujung sel (terminal) dan bagian dekat ujung sel (subterminal). Adanya endospora ini dan sifat fisiologis bakteri *Bacillus* spp. dikenal sebagai bakteri kemoautotrof, karena mampu menggunakan sumber energi anorganik seperti, sulfur, hydrogen, besi dan ammonia, namun tidak dapat tumbuh pada metana. Bakteri pada genus ini memiliki bentuk koloni yang beragam saat ditumbuhkan pada media NA di cawan petri. Karakteristik yang biasanya ada pada kelompok genus ini yaitu, koloni berwarna putih hingga kekuningan dengan tepian tidak rata, tidak berlendir

dan tidak mengkilat bahkan ada yang berbentuk cenderung kering dengan koloni yang besar (Hatmanti, 2000).

5.4 Penapisan Fitokimia Ekstrak Bakteri Endofit

Ekstraksi isolat bakteri endofit didapatkan melalui proses fermentasi yang kemudian ekstrak dikeringkan dengan metode freeze Drying. Menurut Julianto (2019), penggunaan ekstraksi metode pengeringan beku (Freeze drying) dapat dilakukan pada sampel yang labil terhadap panas dan berbahan halus. Pada metode ini terjadi proses sublimasi yakni padatan sampel diubah menjadi fase gas tanpa memasuki fase cair. Sampel dengan pelarut yang memiliki titik didih rendah akan di proses lebih cepat, selain itu penggunaan metode ini berpotensi mendapatkan senyawa fenolik lebih tinggi daripada pengeringan udara.

Metabolit sekunder pada mikroorganisme mulai diproduksi pada fase idiofase yakni saat memasuki fase stasioner dimana terjadi persaingan nutrisi dimana jumlah sel yang hidup sama dengan jumlah sel yang mati. Sehingga terjadi persaingan untuk bertahan hidup. Biosintesis metabolit sekunder senyawa fenol (flavonoid dan tannin) diproses melalui jalur asam sikimat dan asam malonat atau asam asetat. Sedangkan senyawa terpen dan steroid diproses melalui jalur asam mevelonat dan deoksiselulosa serta senyawa alkaloid diproses melalui jalur asam sikimat (Anggraito, dkk 2018). Berdasarkan hasil uji fitokimia ekstrak bakteri endofit dapat diamati pada tabel 5.6.

Tabel 5.6 Hasil Uji Fitokimia Bakteri Endofit Tanaman *Uvaria rufa*

Uji Fitokimia	Ekstrak Isolat Bakteri							
	1	2	3	4	5	6	7	8
flavonoid	+	+	+	+	+	+	+	+
Alkaloid	+	+	-	+	+	+	+	+
Saponin	-	-	+	-	+	+	-	+
Steroid	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpenoid	-	-	-	-	-	-	-	-
Tannin	+	-	-	-	-	-	-	-

(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020)

Berdasarkan tabel 5.6 diketahui bahwa ekstrak 6, 7, dan 8 merupakan ekstrak isolat yang di isolasi pada organ daun tanaman, berdasarkan penelitian macaobo et.al, (2012), daun *Uvaria rufa* mengandung senyawa metabolit sekunder seperti Flavonoid, steroid dan terpenoid serta senyawa lainnya seperti senyawa aromatik laktone, asetilenin dan alkaloid. Sedangkan ekstrak 1,2,3,4 dan 5 merupakan ekstrak isolat yang di isolasi dari kulit batang tanamannya. Kandungan senyawa pada kulit batang tanaman *Uvaria rufa* yang di ekstraksi menggunakan pelarut metanol metode penapisan melalui kromatografi lapis tipis dilaporkan dalam penelitian Rosandy et.al (2013), menunjukkan hasil isolasi dan karakterisasi senyawa yang terkandung dalam organ tanaman tersebut yakni kelompok terpenoid dan flavonoid. Selain itu menurut Heyne (1987) dalam Wijaya (2013), menyatakan bahwa daun dan batang pada tanaman *Uvaria rufa* ini memiliki kandungan senyawa alkaloid sehingga dijadikan obat oleh suku dayak di kalimantan timur. Hal ini menunjukkan bahwa adanya hubungan antara metabolit sekunder yang diproduksi oleh bakteri endofit dan tanaman inangnya, Pada keduanya terdeteksi adanya senyawa metabolit sekunder flavonoid dan alkaloid. Sehingga sesuai dengan pernyataan Wilson dkk (2017) bahwasannya terjadi proses transfer materi genetik antara bakteri endofit dan tanaman inangnya. Namun pada ekstrak 3, tidak terdeteksi adanya kandungan senyawa alkaloid.

Berdasarkan penelitian Budiarti (2018), melakukan uji fitokimia pada ekstrak bakteri endofit yang dibedakan berdasarkan waktu fermentasi, hasilnya dalam ekstrak isolat yang sama tapi dengan waktu fermentasi yang berbeda juga terdapat perbedaan senyawa metabolit sekunder yang diproduksi. Hasilnya tidak terdeteksi senyawa metabolit sekunder tannin pada jam fermentasi yang terlalu pendek. Sehingga mengindikasikan bahwa belum tersintesis atau jumlahnya sedikit sehingga tidak terdeteksi saat penapisan fitokimia secara kualitatif.

Sedangkan untuk senyawa terpenoid tidak terdeteksi pada ekstrak bakteri endofit baik isolasi pada daun maupun kulit batang, hal ini disebabkan ekstraksi bakteri endofit menggunakan pelarut air. Air termasuk dalam pelarut polar, sedangkan senyawa terpenoid dan steroid merupakan senyawa non polar sehingga senyawa tersebut tidak terlarut dalam pelarut. Hal ini sesuai dengan penelitian Prayoga dkk (2019), pada penelitiannya melakukan ekstraksi daun Pepe dengan beberapa pelarut yaitu, aquades, etil asetat, aseton, etanol dan methanol. Hasilnya senyawa steroid dan terpenoid tidak terdeteksi pada ekstrak dengan pelarut aquades dan etanol yang merupakan pelarut polar.

Sementara senyawa saponin yang tidak terdeteksi pada kedua ekstrak tanaman, dijelaskan dalam Anggraito dkk (2019), bahwa saponin merupakan kelompok steroid dan triterpen glikosida. Saponin dapat larut pada pelarut polar karena saponin memiliki unsur gula yang dapat larut pada air dan unsur lemak (Steroid atau triterpen) pada suatu molekul sehingga bersifat seperti detergen. Sedangkan menurut Habibi dkk (2018), menyatakan bahwa Saponin memiliki glikosil sebagai gugus polar serta gugus steroid atau triterpenoid sebagai gugus

nonpolar sehingga bersifat aktif permukaan dan membentuk misel saat dikocok dengan air dan terlihat seperti busa. Kemudian adanya senyawa tannin pada ekstrak 1, dijelaskan pada Anggraito dkk (2019), bahwasannya tannin merupakan kelompok senyawa fenol seperti flavonoid (Ergina, 2014).

Pengujian senyawa alkaloid menggunakan reagen mayer, ditandai dengan adanya endapan putih yang diduga endapan tersebut adalah kompleks kalium-alkaloid. Reagen mayer berasal dari larutan mercury (II) klorida dan kalium iodida membentuk endapan merah mercury (II) iodide dan apabila ada penambahan kalium iodide berlebih maka akan terbentuk kalium tetraiodomerkurat(II). Alkaloid memiliki atom nitrogen dan memiliki pasangan elektron bebas sehingga dapat berikatan secara kovalen koordinat dengan ion logam. Pada uji ini nitrogen pada alkaloid akan berikatan dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) dan membentuk endapan putih (Agustina dkk, 2018).

Pada uji flavonoid adanya penambahan logam Mg dan larutan HCl, adalah untuk mereduksi unsur inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid, sehingga terbentuk senyawa garam flavilium yang berwarna merah atau jingga. Metabolit ini memiliki dua cincin aromatik dengan gugus hidroksil (-OH) lebih dari satu. Sehingga tingkat kelarutan dalam air atau pelarut polar lainnya lebih besar (Ergina, 2014).

Uji tannin menggunakan pereaksi $FeCl_3$, digunakan untuk mendeteksi senyawa fenol, dengan adanya ikatan ion Fe^{3+} sebagai atom pusat yang akan berikatan dengan atom O pada tannin yang memiliki pasangan elektron bebas

Escherchia coli karena zona hambat yang terbentuk <5mm sehingga berpotensi lemah terhadap bakteri uji. Zona hambat terbesar dimiliki oleh kontrol positif yang menggunakan antibiotik ciprofloxacin yakni >20 mm yang menandakan aktivitas antibakteri sangat kuat. Menurut Rachmad (2017), Ciprofloxacin merupakan antibiotik berspektrum luas dari golongan Fluorokuinolon bersifat bakteriosida yang bekerja secara difusi pasif melalui protein yang terdapat pada membran sel kemudian menonaktifkan produksi enzim sintesis DNA dan protein bakteri yakni enzim DNA girase dan topoisomerase IV sehingga terjadi kematian sel. Sedangkan pada kontrol negatif tidak terbentuk zona hambat hal ini sesuai dengan Trisia dkk (2018), Pada penelitiannya menggunakan DMSO sebagai pelarut ekstrak dan kontrol negatif uji antibakteri, menyatakan bahwa DMSO tidak membentuk zona hambat karena tidak bersifat bakteriosida selain itu larutan ini dapat digunakan sebagai pelarut senyawa polar maupun non polar. sehingga terbentuknya zona hambat merupakan respon dari masing-masing ekstrak bakteri.

Pengamatan pada gambar 5.3 menunjukkan bahwa pada ekstrak 1,3, 5, 7 dan 8 semakin tinggi konsentrasi maka zona hambat yang terbentuk semakin besar. Namun, pada ekstrak 7 tidak terbentuk zona hambat di konsentrasi 3 mg/ml dan 4 mg/ml. Sedangkan pada ekstrak 2, 4 dan 6 semakin tinggi konsentrasi tidak selalu diimbangi dengan meningkatnya zona hambat yang terbentuk. Pada ekstrak 2 dan 4 konsentrasi 10 mg/ml memiliki zona hambat lebih besar daripada konsentrasi lainnya namun terjadi penurunan zona hambat pada konsentrasi 5mg/ml dan 4 mg/ml yang lebih rendah daripada konsentrasi 3 mg/ml. sedangkan pada ekstrak 6, zona hambat terbesar dimiliki oleh

konsentrasi 5 mg/ml. Menurut Septiani, dkk (2017), pada penelitiannya melakukan pengujian aktivitas antibakteri melalui pengukuran diameter zona hambat yang dibedakan berdasarkan lama inkubasi dan konsentrasi ekstrak dengan menggunakan metode difusi. Melalui penelitian tersebut diketahui bahwa diameter zona hambat tidak selalu naik sebanding dengan semakin tinggi konsentrasi yang diberikan dan lama waktu inkubasi, hal ini terjadi karena adanya perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar. Selain itu pada penelitian Pangaribuan dkk (2019), menyatakan bahwa faktor yang menyebabkan perbedaan zona hambat dipengaruhi oleh kecepatan difusi ekstrak, jumlah mikroorganisme yang diinokulasi, sifat media agar, kecepatan tumbuh bakteri dan konsentrasi bahan kimia serta kondisi saat inkubasi.

Lemahnya aktivitas antibakteri dari ekstrak bakteri endofit terhadap patogen *Escherchia coli* diduga karena kurangnya optimasi saat fermentasi bakteri endofit, Hal ini karena belum dilakukannya pengukuran kurva pertumbuhan bakteri sehingga belum diketahui waktu optimum saat produksi metabolit sekunder oleh bakteri. Seperti pada penelitian Budiarti (2018), melakukan pengukuran kurva pertumbuhan bakteri endofit F-3B dari tanaman pepaya, bakteri tersebut mulai memasuki fase log pada jam ke-4, kemudian pada jam ke-20 mulai memasuki fase stasioner dan memasuki fase kematian dimulai pada jam ke-38 sampai jam ke-48. Pada penelitiannya melakukan perbedaan waktu fermentasi yakni pada jam ke-32, 36, dan 38 alasannya karena Menurut Brock dan Madigan (2006) dalam Budiarti (2018), fase stasioner menuju kematian merupakan waktu yang tepat untuk memproduksi bagi bakteri sehingga

pengujian hipotesis dapat dilakukan membandingkan nilai chi square hitung dengan chi-square tabel atau melalui perbandingan nilai p-value dengan galatnya (0,05). Perhitungan hasil chi square diperoleh nilai chi square hitung > chi square tabel ($55,678 > 11,070$) maka H_0 ditolak dan H_a diterima. Begitu juga dengan nilai p-value < 0.05 ($0.00 < 0.05$) maka H_0 ditolak dan H_a diterima. Berdasarkan penelitian ini dapat ditarik pernyataan dimana terdapat perbedaan efektivitas antibakteri (diameter zona hambat) antara masing-masing konsentrasi ekstrak isolat bakteri endofit dari tanaman Lelak (*Uvaria rufa* Blume) terhadap bakteri patogen *Escherichia coli*.

Hasil dari penelitian ini aktivitas antibakteri dari beberapa ekstrak bakteri endofit terhadap bakteri uji tergolong lemah. Namun adanya zona bening yang terbentuk menunjukkan bahwa kandungan senyawa pada ekstrak bakteri endofit berdasarkan penapisan fitokimia, berpengaruh pada terbentuknya zona hambat. Hasil dari penapisan fitokimia yang dilakukan ekstrak bakteri endofit mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu senyawa flavonoid, alkaloid, saponin dan tannin.

Senyawa flavonoid memiliki beberapa aktivitas antibakteri yakni pertama mengganggu permeabilitas membran sel, dengan mengikat protein ekstraseluler bakteri dan terjadi penggumpalan atau terdenaturasi sehingga membran sel tidak berfungsi. Kemudian melalui penghambatan penggunaan oksigen pada sitokrom C reduktase yang berperan dalam proses metabolisme energi pada bakteri, sehingga bakteri tidak memiliki energi untuk sintesis makromolekul yang dibutuhkan. Selain itu menghambat enzim DNA girase bakteri yang berperan dalam proses

replikasi DNA sehingga tidak melakukan sintesis asam amino untuk pertumbuhan bakteri (Mufti dkk, 2017).

Senyawa saponin memiliki kemampuan untuk menarik air (hidrofilik) dan larut dalam lemak (lipofilik). Saponin akan berikatan dengan membran sel melalui interaksi dengan struktur hidrofiliknya. Hal tersebut dapat mengganggu permeabilitas membran sel bakteri dengan mengubah struktur dan fungsi membran sel. Saponin akan bereaksi dengan sterol yang menyebabkan ketidakstabilan dalam transfer ion dan makromolekul sebagai akses metabolisme bakteri melalui pembentukan single ion channel sehingga membran sel akan lisis dan bakteri mati (Mufti dkk, 2017).

Senyawa alkaloid memiliki struktur atom nitrogen dan atom hydrogen pada gugus amina, Kemudian atom nitrogen tersebut dapat menyumbangkan proton dari atom hydrogen agar bisa berikatan dengan protein, enzim dan reseptor bakteri. Mekanisme gangguan oleh senyawa ini adalah mengganggu komponen penyusun peptidoglikan sel bakteri. Atom nitrogen akan berikatan dengan asam amino penyusun sel dan DNA bakteri, yang mengakibatkan berubahnya struktur dan susunan asam amino yang kemudian berpengaruh pada keseimbangan genetik pada rantai DNA lalu tidak terbentuknya peptidoglikan yang normal (Budiarti, 2018).

Senyawa tanin yang merupakan kelompok polifenol memiliki struktur yang terdiri dari gugus hidroksil dan karboksil. Mekanisme antibakteri oleh senyawa tannin ini memiliki tiga cara yakni pertama, pengikatan pada protein, substrat atau enzim mikroba melalui ikatan hydrogen yang menyebabkan protein terdenaturasi

- Nisa, Khoirun. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Fungi Endofit dan Ekstrak Daun dari *Chromolaena Odorata* terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae*. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Ampel, Surabaya.
- Nkunyaa, Mayunga H.H., Stephan A. Jonkera, Rene' de Gelderb., Sabina W. Wachiraa and Charles Kihampaa. 2003. Schefflone: a trimeric monoterpenoid from the root bark of *Uvaria scheffleri*. *Journal of Phytochemistry Elsevier*. 65: 399–404.
- Nurhayati. 2011. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun ubi Jalar (*Ipoema batatas* L.), Cultivar Umbi Putih Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Skripsi*. Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Alauddin, Makassar.
- Pangaribuan, Benny Bradley Pradana., Tri Umania Soleha dan Muhammad Ricky Ramadhian. 2019. Perbandingan Daya Hambat Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper Betle* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*. *Journal of Agromedicine*. Vol. 6 (2):400-404.
- Pattuju, Sarah Mariana., Fatimawali dan Aeltje Manampiring. 2014. Identifikasi Bakteri Resisten Merkuri pada Urine, Feses, dan Kalkulus Gigi pada Individu di Kecamatan Malalayang, Manado, Sulawesi Utara. *Jurnal e-Biomedik*. Vol.2 (2): 532-540
- Pelczar, Michael dan Chan. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Pratiwi, Sylvia T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga, Jakarta.
- Prayoga, Dewa Gede Eka., Komang Ayu Nocianitri., Ni Nyooman Puspawati. 2019. Identifikasi Senyawa Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Daun Pepe (*Gymnema reticulatum* Br.) pada Berbagai Jenis Pelarut. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pakan*. Vol.8 (2): 111-121.
- Priharta, Antonius Alfian Yuan Dias. 2008. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dalam Batang Tanaman *Artemisia annua* L. yang di Uji Potensi Antibakterinya terhadap *Esherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
- Purwanto, Ukhradiya Magharaniq Safira., Fachriyan Hasmi Pasaribu dan Maria Bintang. 2014. Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Potensinya Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri. *Journal of Current Biochemistry*. Vol. 1 (1): 51 – 57.

- Putri, Ega Heryani., Yuliani dan Lisa Lisdiana. 2017. Identifikasi Isolat Bakteri Endofit A1 dan B1 dari Akar Tanaman Ubi Jalar (*Ipomoea Batatas*) Var. Papua Patippi Berdasarkan Karakter Fenotipik. *Jurnal Lentera Bio*. Vol.6 (3): 62-69.
- Putri, Risna Wahyu ananda. 2016. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella* sp. Pada Jajanan Batagor di Sekolah Dasar Negeri di Kelurahan, Psangan, Cirendeui, dan Cempaka Putih Kecamatan Ciputat Timur. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Rachmad, Basuki. 2017. Isolasi dan Identifikasi Gen Resistensi Ciprofloxacin pada Isolat *Escherichia coli Multidrug Resistance* dari Penderita Infeksi Saluran Kemih di RSUD Abdoel Moeloek Provinsi Lampung. *Tesis*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, Lampung.
- Ragil, Dyah dan Yuanita Dyah. 2017. Hubungan Antara Pengetahuan dan Kebiasaan Mencuci Tangan Pengasuh dengan Kejadian Diare Pada Balita. *Journal of Health Education*. 2 (1): 39-46.
- Rahmawati, Nurina., Edhy Sudjarwo dan Eko Widodo. 2014. Uji aktivitas antibakteri ekstrak herbal terhadap bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmu Peternakan*. Vol.24 (3): 24 – 31.
- Ramadhan, Tegar Rezavie. 2009. Kontaminasi Bakteri *Escherichia coli* pada Produksi Depot Air Minum di kecamatan Pancoran Mas, Depok, Tahun 2009. *Skripsi*. Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Indonesia. Depok.
- Rohmah, Nita Shilfiani. 2017. Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berpotensi sebagai Agen Bioremediasi Timbal (Pb) dari Lumpur Lapindo. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Rosandy, Andi R., Laily B. Din., W.A. Yaacob., Nik Idris Yusoff., Sahidin., Jalifah Latif., Syarul Nataqain., Normah Mohd Noor. 2013. Isolation and Characterization of Compounds From The Srem Bark of *Uvaria rufa* (Annonaceae). *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*. Vol. 17 (1): 50-58.
- Safitri, Elis. 2019. Uji Presipitasi Kalsium Karbonat (CaCO_3) Oleh Bakteri Ureolitik dari gua Kembar di Kawasan Karst Malang, Jawa Timur. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Ampel, Surabaya.

- Sastromidjojo, H. 1985. *Kromatografi*. Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Septiani, Eko Nurcahya Dewi dan Ima Wijayanti. 2017. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Lamun (*Cymodocea rotundata*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Saintek Perikanan (IJFST)*. Vol. 13(1): 1-6.
- Silvia, Devi. 2018. Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak kulit Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap Jamur *Candida albicans*. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Ampel, Surabaya.
- Strobel, Gary A and Bryn Daisy. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Journal of Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 67 (4): 491-502.
- Strobel, Gary A. 2002. Microbial Gift From Rain Forest. *Can. J. Plant Pathol.* Vol. 24: 14-20.
- Sumampouw, Oksfriani Jufri. 2018. Uji Sensitivitas Antibiotik Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Penyebab Diare Balita di Kota Manado. *Journal of Current Pharmaceutical Science*. Vol. 2 (1): 104-110.
- Sutiknowati, Lies Indah. 2016. Bioindikator Pencemar, Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Oseana*. Vol. 41 (4): 63-71.
- Thang, Luu Hoang, Nguyen Tuan, Do Dai, Isiaka Ogunwande & Nguyen Hung. 2017. Analysis of the Leaf Essential Oils of *Uvaria grandiflora* Roxb. ex Hornem. and *Uvaria microcarpa* Champ. ex Benth. (Annonaceae) from Vietnam Tran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 20 (2): 496 – 501.
- Trisia, Adelgrit., Regina Philyria dan Angeline Novia Teomon. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kalanduyung (*Guazuma ulmifolia* Lam.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Metode Difusi Cakram (Kirby-Bauer). *Jurnal Anterior*. Vol 17 (2): 136-143.
- Vos, Paul De., George M. Garrity., Dorothy Jones., Noel R. Krieg., Wolfgang Ludwig., Fred A. Rainey., Karl-Heinz Schleifer and William B. Whitman. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology second edition volume three The Firmicutes*. Springer, London New York.
- Widoyono. 2008. *Penyakit Tropis Epidemiologi, Penularan, Pencegahan dan pemberantasannya*. Erlangga, Jakarta.
- Wijaya, Viriyanata., Supriyatna, dan Tiana Milanda. 2013. Daun Tendani (*Goniothalamus macrophyllus* Hook. f. & Thomson.) Suatu Obat

- Tradisional Antibakteri Suku Dayak Punan di Kalimantan Timur. *Jurnal Fitofarmaka*. Vol.3 (2): 1-9.
- Wilson, Wildiani., Yekti Asih Purwestri dan Langkah Sembiring. 2017. Isolasi, Karakterisasi dan Skrining Antimikrobia Bakteri Tanaman Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.). *Jurnal Labora Medika*. Vol. 1 (1): 1-6.
- Winarni, Fajar dan Dinarjati Eka Puspitasari. 2013. Peran Pemerintah dalam Penanggulangan Pencemaran Air Tanah Oleh Bakteri E.Coli di Kota Yogyakarta. *Mimbar Hukum*. Vol. 25 (2): 219-230.
- Wiyakrutta, Suthep., Nongluksna Sriubolmas., Wattana Panphut., Nuntawan Thongon., Kannawat Danwisetkanjana., Nijisiri Ruangrunsi and Vithaya Meevootisom. 2004. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Vol. 20: 265–272.
- Zhu, Liu Ji., Yan Han-Jing, Gao Xiao-xia. 2009. Microstructure and Endophytic Fungus Distribution of The Stem and Leaves of *Uvaria microcarpa*. *Journal of Guangdong Pharmaceutical College*. 1 (1).
- Zulkifli, L., Dwi Soelistya Dyah Jekti dan Samsul Bahri. 2018. Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Endofit Kulit Batang Srikaya (*Annona squamosa*) dan Potensinya sebagai Antibakteri. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA (JPPIPA)*. 4(1): 21-29.