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

SKRIPSI



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 RUFA 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

Dosen Pembimbing 2

Eva Agustina, M.Si

NIP. 198908302014032008

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 III

Sri Aldayati L, SKM, M.Kes

NIP. 198201252014032001

Penguji II

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

NIP. 198604242014031003

Penguji IV

<u>Drs. Aldul Manan, M.Pd.I</u> 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: perpus@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:

8	1
Nama	: IKA ISNAYANTI
NIM	: H01216010
Fakultas/Jurusan	: SAINS DAN TEKNOLOGI/BIOLOGI
E-mail address	: yanti.gresikoi.07@gmail.com
UIN Sunan Ampe ■ Sekripsi □ yang berjudul:	gan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan l Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah : Tesis Desertasi Lain-lain () DENIFIKASI BAKTERI ENDOFIT DARI DAUN DAN KULIT BATANG
	AK (Uvaria rufa Blume) SEBAGAI ZAT ANTIBAKTERI
beserta perangkat Perpustakaan UII mengelolanya da menampilkan/mer akademis tanpa p	yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Ekslusif ini Non-
	tuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN abaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta saya ini.
Demikian pernyata	aan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 7 Agustus 2020

Penulis

(Ika Isnayanti)

ABSTRAK

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

Bakteri endofit merupakan bakteri yang dapat diisolasi dari organ tanaman karena bakteri ini hidup berasosiasi di dalam jaringan tanaman inangnya. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bakteri endofit dapat memproduksi metabolit sekunder yang bermanfaat bagi kesehatan. Timbulnya resistensi antibiotik terhadap mikroba patogen maka perlu adanya upaya seperti pengembangan zat antimikroba baru dari bahan alam untuk mengatasinya. Pada penelitian bertujuan untuk mengetahui bakteri endofit yang terdapat pada tanaman *Uvaria rufa* serta potensinya dalam menghambat pertumbuhan patogen Escherichia coli melalui metabolit sekunder yang diproduksi. Sampel daun dan kulit batang tanaman diisolasi dan dipurifikasi, selanjutnya dilakukan ekstraksi isolat bakteri endofit menggunakan metode freeze drying, kemudian dianalisis kandungan metabolit sekunder melalui penapisan fitokimia dan ekstrak kering diuji antibakteri metode difusi cakram dengan konsentrasi masing-masing ekstrak 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml dan 10 mg/ml. Hasil penelitian ini terdapat 5 isolat bakteri endofit pada kulit batang tanaman dan 3 isolat dari daun tanaman, berdasarkan karakterisasi semua isolat diduga termasuk kelompok dari genus Bacillus. Metabolit sekunder yang terkandung dari ekstrak bakteri endofit yakni flavonoid, alkaloid, saponin dan tannin pada beberapa ekstrak memiliki kandungan yang berbeda. Pada uji antibakteri semua ekstrak di semua konsentrasi memiliki kemampuan yang tergolong penghambatan lemah terhadap bakteri uji karena zona hambat yang terbentuk <5mm. Zona hambat terbesar yang terbentuk dari ekstrak 8 pada konsentrasi 10 mg/ml. Sehingga perlunya penelitian lanjutan mengenai produksi dan potensi dari ekstrak bakteri endofit.

Kata kunci: Uvaria rufa, isolasi, identifikasi, endofit, metabolit sekunder dan antibakteri.

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA FROM LEAVES AND STEAM BARK OF LELAK PLANT (Uvaria rufa Blume) AS AN ANTIBACTERIAL

Endophytic bacteria are bacteria that can be isolated from plant organs because these bacteria live in association in their host plant tissues. Several studies have shown that endophytic bacteria can produce secondary metabolites that are beneficial to health. The emergence of antibiotic resistance against pathogenic microbes requires efforts such as the development of new antimicrobial substances from natural ingredients to overcome it. The aim of this research is to find out the endophytic bacteria found in *Uvaria rufa* plants and their potential to inhibit the growth of Escherichia coli pathogens through secondary metabolites produced. Leaves samples and steam bark were isolated and purified, then extracted the endophytic bacterial isolates using the freeze drying method, then analyzed the content of secondary metabolites through phytochemical screening and the dry extracts were tested for antibacterial test by the disc diffusion method with a concentration of each extract 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml and 10 mg/ml. The results of this study contained 5 endophytic bacterial isolates on steam bark and 3 isolates from leaves, based on the characterization of all isolates thought to belong to the genus *Bacillus*. The secondary metabolites contained in the extracts of endophytic bacteria, namely flavonoids, alkaloids, saponins and tannins in some extracts have different contents. In the antibacterial test, all extracts at all concentrations had the ability that was classified as weak inhibition against the tested bacteria because the inhibition zone formed was 5mm. The largest inhibition zone formed from extract 8 at a concentration of 10 mg/ml. So that the need for further research on the production and potential of endophytic bacterial extracts.

Key words: *Uvaria rufa*, isolation, identification, endophytes, secondary metabolites and antibacterial.

DAFTAR ISI

Halaman Pernyataan Keaslian Karya	. i
Lembar Persetujuan Pembimbing	. ii
Lembar Pengesahan	. iii
Lembar Pernyataan Persetujuan Publikasi	. iv
Abstrak	V
Abstrack	vi
Daftar Isi	
Daftar Tabel	ix
Daftar Gambar	
BAB I PENDAHULUAN	. 1
1.1 Latar Belakang	. 1
1.2 Rumusan Masalah.	
1.3 Tujuan Penelitian	
1.4 Manfaat Penelitian	. 8
1.5 Batasan Penelitian	. 8
BAB II TINJAUAN PUST <mark>AKA</mark>	. 9
2.1 Tanaman <i>Uvaria rufa</i>	. 9
2.2 Bakteri Endofit	. 12
2.3 Escherichia coli	
2.4 Metabolit Sekunder	. 17
2.5 Identifikasi Mikroorganisme	. 20
2.6 Antibakteri	. 22
2.6.1 Metode Difusi	. 24
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	. 26
3.1 Kerangka konsep	. 26
3.2 Hipotesis Penelitian	. 27
BAB IV METODE PENELITIAN	. 28
4.1 Rancangan Penelitian	. 28
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	
4.3 Alat dan Bahan	

4.4 V	'ariabe	l Penelitian	30
4.5 P	rosedu	r Penelitian	30
4	1.5.1	Sterilisasi alat	30
4	1.5.2	Teknik Pengambilan Sampel	30
4	1.5.3	Teknik steril dan aseptik	31
4	1.5.4	Pembuatan media	31
4	1.5.5	Isolasi bakteri endofit	35
4	1.5.6	Pemurnian dan Peremajaan Bakteri Endofit	36
4	1.5.7	Identifikasi bakteri endofit	36
4	1.5.8	Ekstraksi metabolit sekunder bakteri endofit	42
4	1.5.9	Uji fitokimia ekstrak bakteri endofit	42
4	1.5.10	Peremajaan bakteri uji	43
4	1.5.11	Pembuatan Suspensi Bakteri	43
		Uji antibakteri metode difusi	
4	1.5.13	Pengolaha <mark>n l</mark> imbah media biakan bakteri	44
		Data	
BAB V HA	ASIL E	DAN PEMBAHASAN	46
		lan Purifikasi Bakteri Endofit	
		isasi Bakteri Endofit	
5.3 Id	dentifik	xasi Bakteri Endofit	57
5.4 P	enapisa	an Fitokimia Ekstrak Bakteri Endofit	60
5.5 U	Jji Akti	vitas Antibakteri	62
BAB VI K	ESIM	PULAN DAN SARAN	74
6.1 K	Cesimp	ulan	74
6.2 S	aran		74
DAFTAR	PUST	AKA	76

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Jenis Bakteri Endofit yang telah diisolasi dari berbagai tumbuhan 13
Tabel 2.2	Karakterisasi pewarnaan gram
Tabel 2.3	Antibiotik yang diproduksi oleh mikroorganisme
Tabel 4.1	Jadwal pelaksanaan penelitian
Tabel 5.1	Hasil Isolasi Bakteri Endofit Tanaman <i>Uvaria rufa</i>
Tabel 5.2	Karakter Makroskopis Bakteri Endofit Tanaman Uvaria rufa 49
Tabel 5.3	Karakter Mikroskopis Bakteri Endofit Tanaman Uvaria rufa 51
Tabel 5.4	Hasil Uji Biokimia Bakteri Endofit Tanaman <i>Uvaria rufa</i>
Tabel 5.5	Karakteristik Identifikasi Genus Bacillus
Tabel 5.6	Hasil Uji Fitokimia Bakteri Endofit Tanaman Uvaria rufa 61
Tabel 5.7	Analisis Hasil Aktivitas Antibakteri pada Setiap Ekstrak
Tabel 5.8	Analisis Hasil Aktivitas Antibakteri pada Setiap Konsentrasi 69

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tanaman Uvaria rufa	1.
Gambar 2.2	Biosintesis Metabolit Sekunder	18
Gambar 5.1	Koloni Tunggal Bakteri Metode Streak Plate	48
Gambar 5.2	Pengamatan Mikroskopis Bakteri Endofit	5(
Gambar 5.3	Nilai rata-rata Uii Antibakteri Ekstrak Endofit	65



BABI

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki potensi sumber daya alam berlimpah. Eksplorasi potensi keanekaragaman hayati diperlukan untuk mendukung kelangsungan hidup semua makhluk hidup. Hal tersebut perlu didukung dengan adanya teknologi yang tepat guna sehingga terpeliharanya keseimbangan ekosistem. Salah satu sumber daya hayati adalah tanaman, dimana setiap tanaman memiliki senyawa tertentu yang bermanfaat bagi kesehatan, seperti kandungan metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan senyawa yang dihasilkan oleh beberapa flora, fauna invertebrata maupun mikroorganisme. Metabolit sekunder dapat dimanfaatkan sebagai zat antibakteri, antijamur, antioksidan dan lainnya, dimana zat tersebut tidak digunakan dalam pertumbuhan dan perkembangan flora atau fauna tersebut. Kandungan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai obat terdiri atas senyawa fenolik, alkaloid, terpenoid beserta turunannya. Salah satu cara untuk mendapatkan metabolit sekunder adalah dengan ekstraksi isolat bakteri endofit pada tanaman tertentu (Khotimah, 2016). Seperti yang dijelaskan pada qur'an surat Thaha (20) ayat 53:

Artinya: "yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan telah menjadikan bagimu bumi itu jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka kami tumbuhkan dari air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-

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

dengan cepat, karena pada saat ini kebutuhan obat meningkat seiring terjadinya penyakit akibat bakteri patogen yang tersebar di lingkungan.

Saat ini sebagian besar lingkungan kita telah tercemar oleh adanya bakteri *Escherichia coli*, dimana dapat ditemukan pada sumber air, tanah sampai produk makanan dan minuman yang dikonsumsi. Bakteri ini dapat bersifat patogen bagi kesehatan manusia, seperti penyebab penyakit diare yang dapat berujung kematian. Pada penelitian Widoyono (2008), lebih dari 80% kematian batita adalah diare, dimana setiap anak mengalami diare rata-rata 3,3 setiap tahun. Menurut Ragil dan Yuanita (2017), diare dapat menyerang semua kelompok usia yang masih menjadi masalah kesehatan, dimana *E. coli* menyumbang 20-30% penyebab diare. Hal tersebut sudah menjadi kejadian umum yang harus diterima karena pola hidup bersih dan sehat yang jarang diterapkan dalam kehidupan sehari-hari (Winarni, 2013). Sesuai dengan firman Allah SWT pada qur'an surat An-Nisa (4) ayat 28:

"Allah hendak memberikan keringanan kepadamu, dan manusia dijadikan bersifat lemah".

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT membuat manusia bersifat "lemah" yang artinya kondisi tubuh kurang sehat, dimana salah satunya dapat disebabkan karena infeksi oleh mikroorganisme patogen seperti bakteri *Escherichia coli*. Sehingga perlu adanya obat antimikroba dalam mengatasi hal tersebut.

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), malakukan 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 abtibiotik 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, ο-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*, hasinya 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 *Arthrinium* 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,

ergosterol peroksida, asam p-hidroksibenzoat, dan 4-hydroxybenzal -dehyde. Isolasi jamur endofit tanaman *Uvaria rufa* telah dilakukan oleh Wiyakruta et.al (2004), pada penelitiannya melakukan uji antimikroba, antikanker, anti malaria dari tanaman obat yang ada di Thailand. Belum ada penelitian mengenai bakteri endofit pada tanaman *Uvaria rufa*, sehingga adanya potensi isolat jamur pada tanaman tersebut, mengindikasikan adanya bakteri yang dapat diisolasi dari tanaman tersebut.

Berdasarkan uraian di atas pada penelitian ini melakukan isolasi dan identifikasi bakteri endofit pada daun dan kulit batang tanaman *Uvaria rufa* famili Annonaceae untuk di uji aktivitas potensi antibakteri terhadap patogen *Escherichia coli*.

1.2 Rumusan Masalah

- 1. Apa saja bakteri endofit yang dapat diisolasi dari daun dan kulit batang tanaman *Uvaria rufa*?
- 2. Apa saja kandungan metabolit sekunder pada ekstrak bakteri endofit dari daun dan kulit batang tanaman *Uvaria rufa*?
- 3. Bagaimana potensi dari ekstrak bakteri endofit dari daun dan kulit batang tanaman *Uvaria rufa* terhadap diameter zona hambat pada uji antibakteri patogen *Escherichia coli*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

a. Mengidentifikasi isolat bakteri endofit dari daun dan kulit batang tanaman *Uvaria rufa* secara morfologi dan biokimia.

- b. Mengetahui kandungan metabolit dari ekstrak bakteri endofit pada daun dan kulit batang tanaman *Uvaria rufa*.
- c. Mengetahui dan mempelajari aktivitas antibakteri dari ekstrak bakteri endofit pada daun dan kulit batang tanaman *Uvaria rufa* terhadap *Escherichia coli*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Memberikan informasi mengenai potensi ekstrak bakteri endofit dari daun dan kulit batang tanaman *Uvaria rufa* melalui kandungan metabolit sekundernya.
- b. Menambah pengetahuan pada bidang mikrobiologi, biokimia dan lainnya.

1.5 Batasan Penelitian

Pada penelitian ini peneliti melakukan batasan penelitian agar dapat fokus dan sesuai dengan tujuan yang direncanakan sebelumnya. Batasan-batasan penelitian sebagai berikut:

- a. Sampel yang dijadikan objek penelitian adalah daun dan kulit batang tanaman *Uvaria rufa*.
- b. Skrining kandungan metabolit sekunder secara kualitatif.
- c. Identifikasi isolat bakteri endofit dari daun dan kulit batang tanaman *Uvaria rufa* melalui karakter morfologi dan biokimia.
- d. Uji aktivitas antibakteri hasil ekstrak isolat bakteri endofit terhadap patogen *Escherichia coli* dilakukan secara difusi.

BAB 11

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Uvaria rufa

Uvaria merupakan kelompok tanaman yang berhabitus liana pada famili annonaceae. Tanaman ini dikenal secara umum dengan nama tanaman Lelak oleh masyarakat Kupang dan Nusa Tenggara Timur. Selain itu untuk nama umum untuk tanaman ini dikenal dengan Dot Carabao, Susung-Kabayo atau Susung kalabaw oleh masyarakat Luar Negeri. Karakteristik pembeda pada kelompok ini dari tanaman liana famili Annonaceae lainnya adalah terdapat bulu pada permukaan organ tanaman baik vegetatif maupun generatif yang berbentuk bintang (stellate hairs). Klasifikasi tanaman Uvaria rufa. berdasarkan sistematika tumbuhan (taksonomi) menurut Deroin dan Mervyn (2013) adalah sebagai berikut:

Kingdom: Plantae

Sub kingdom: Tracheobionta

Divisi : Magnoliphyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Magnoliopsida

Sub kelas : Magnoliidae

Ordo : Magnoliales

Famili : Annonaceae

Genus : Uvaria

Spesies : *Uvaria rufa* Blume

Menurut klasifikasi tersebut tanaman ini tergolong pada kelompok tanaman berpembuluh, dan memiliki biji yang diselimuti 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 besa<mark>r berad</mark>a 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 bedasarkan tingkat evolusinya dengan konsep bunga primitif (uniseksual achlamydeous) (Lestari, 2017).



Gambar 2.1 a. Tumbuhan liana famili Annonaceae dan b. daun *Uvaria* rufa (Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2018)

Tanaman *Uvaria rufa* sendiri secara morfologis termasuk tanaman menjalar ke tanaman lain menggunakan ranting pembelit. Memiliki tipe Percabangan pada batang pokok yang tidak beraturan atau menerus, kulit batang tipis berwarna coklat pada bagian luar dan kuning cerah pada bagian dalam dengan lentisel yang menyebar pada permukaan batang. Daun berwarna hijau muda saat kuncup muda yang memiliki permukaan berambut (*pubescence*) dengan bentuk bintang (*stellate hairs*) dengan ujung meruncing (*acuminate*) dan pangkal bentuk hati atau terbelah (*cordate*), permukaan tepi daun rata (*entire*) serta memiliki pola urat yang menonjol atau timbul (*raised*).

Tanaman ini terdistribusi di daerah tropis hingga sub tropis, pada ketinggian hingga 1500 m. Distribusinya meliputi Indonesia, Cina, Laos, Thailand, Malaysia, Papua Nugini, Filipina, Singapura, Viatnam dan India. Hutan tropis adalah hutan yang berada pada daerah khatulistiwa, sedangkan hutan hujan tropis merupakan tipe dari hutan tropis yang memiliki curah hujan 4000 mm/tahun dengan suhu ± 25°C dan kelembaban berkisar 60-100% (Partini, 2017). Secara keseluruhan terdapat sekitar 500 spesies liana dari famili Annonaceae diketahui paleotropik yang beberapa diantaranya termasuk

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, campestris, Pseudomonas solanacearum, Xanthomonas 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

Tabel. 2.1 Jenis Bakteri Endofit yang Telah Diisolasi dari Beberapa Tumbuhan					
Tanaman Bakteri Endofit yang diisolasi			Prosedur	Pustaka	
kulit batang Annona squamosa	Bacillus brevis Bacillus latesporus Virgibacillus pantothenticus dan Bacillus circulans.	1. 2. 3.	Isolasi bagian tanaman pada media TSA dan NA. Uji antimikroba metode difusi sumuran pada patogen Staphyococcus aureus, Bacillus cereus dan E. coli dengan ekstrak cair pada konsentrasi maksimum. Idetifikasi secara morfologis dan biokimia pada bakteri yang memiliki aktivitas	Zulkifli (2018)	
Batang Artemisia annua	Amphibacillus sp.	1. 2. 3. 1.	akntimikroba. Isolasi bagian tanaman pada media MS Uji antimikroba pada patogen S. aureus metode difusi kertas cakram Idetifikasi secara genetik Isolasi bagian tanaman pada	Priharta (2008)	
Rumput Kebar (<i>Biophytum</i> sp.)	Bacillus megaterium, Staphylococcus saprophyticus dan Enterobacter gergoviae.	 3. 	media NA Uji antimikroba pada patogen S. aureus dan E. coli metode difusi kertas cakram Idetifikasi isolat melalui microbact 12	Fitriyah (2015)	
Daun, bunga, batang dan akar Jeringau (Acorus calamus L.)	Enterobacter sp. dan Pseudomonas sp. strain RR021	 1. 2. 3. 4. 5. 	Isolasi bagian tanaman pada media NA Ekstraksi isolat metode maserasi pada pelarut methanol, etil asetat dan N-Hekasan Skrining fitokimia secara kualitatif Uji antimikroba pada patogen Candida albicans, S. aureus dan E. coli metode difusi kertas cakram 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

batang, daun, akar, kotiledon dan organ lainnya pada periode tertentu. Menurut Strobel (2002), mekanisme interaksi mikroba endofit dengan tanaman inangnya:

- a. Tumbuhan menyediakan nutrisi bagi pertumbuhan mikroba endofit tanpa merusak inangnya.
- b. Tumbuhan menyediakan zat yang dibutuhkan untuk mikroba endofit melanjutkan siklus hidupnya agar tetap tumbuh serta sebagai pertahanan diri.
- c. Mikroba endofit berperan sebagai agen biodegradasi tumbuhan inangnya yang mati.
- d. Interaksi antara mikroba dan tumbuhan inang melibatkan transfer materi genetik. Sehingga senyawa bioaktif yang di produksi tumbuhan juga dihasilkan juga oleh mikroba endofit.

2.3 Escherichia coli

Bakteri *Escherichia coli* ditemukan pada tahun 1885 oleh Theodor Escherich pada balita yang menderita gejala enteritis atau peradangan pada saluran usus, sehingga huruf "E" pada genus mengikuti nama belakang penemunya. Secara mikromorfologis bakteri ini memiliki bentuk batang dengan ukuran panjang ±2 mikrometer dengan diameter ±0,5 mikrometer dan volume sel ±0,7 mikrometer kubik. *E. Coli* dapat hidup pada suhu 20-45°C dengan suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 37°C sehingga tergolong bakteri mesofilik. Bakteri ini masuk pada kelompok bakteri gram negatif yang juga menjadi flora normal pada tubuh makhuk berdarah panas. Sepeti 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 : Escherichia

Spesies : Escherichia coli

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:

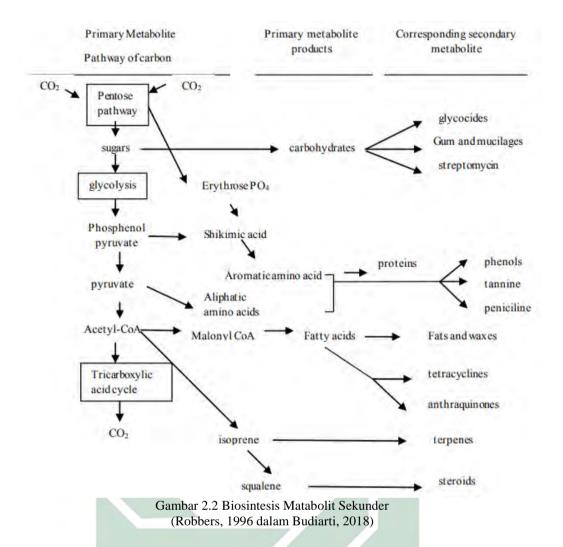
- a. *E. coli* Enteropatogenik (EPEC) merupakan penyebab diare pada bayi dengan cara melekat pada sel mukosa usus kecil. Infeksi EPEC adalah diare dengan feses encer yang mengandung mucus tapi tidak berdarah.
- b. *E. coli* Enterotoksigenik (ETEC) menjadi penyebab diare pada manusiadan hewan terutama 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 wisatwan yang menuju Negara tersebut dan tidak dapat melakukan fermentasi laktosa dengan cepat dan tidak dapat bergerak.
- d. E. coli Enterohomoragik (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°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 Chlorampenicol, Ciproflaxin, 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.



Senyawa ini pada bakteri diproduksi dalam keadaan stress lingkungan yang disintesis dari metabolit primer dan mulai di produksi saat fase stasioner untuk pertumbuhan bakteri, merupakan senyawa yang tidak dapat dimanfaatkan secara langsung sebagai sumber energi sehingga bersifat non esensial untuk pertumbuhan mikrorganisme itu sendiri yang pada prosesnya dibuat dan disimpan secara ekstraselular. Tidak adanya metabolit sekunder yang diproduksi tidak menjadi kematian mikroorganisme itu sendiri melainkan menyebabkan penurunan ketahanan terhadap serangan dari luar.

Setiap spesies memiliki potensi produksi senyawa yang memiliki karakteristik tertentu. Metabolit sekunder disebut sebagai fitoeaksin 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.
- Alkaloid yaitu senyawa yang paling sedikit mengandung satu atom nitrogen yang bersifat basa dan memebentuk cincin heterosiklik.
 Senyawa ini berfungsi untuk penghambatan proses sintesis dinding sel, shingga sel lisis.
- c. Fenol yaitu senyawa teroksidasi yang diperoleh dari reaksi dengan gugus sulfihidril, fungsinya adalah untuk penyebab gangguan pada intregritas membran sel dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme.
- d. Terpenoid yaitu senyawa yang tesusun 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.

2.5 Identifikasi Mikroorganisme

Identifikasi bakteri dilakukan untuk mengetahui klasifikasi hasil karakterisasi melalui beberapa dapat sifat baik makroskopis melalui koloni bakteri, mikroskopis melalui pewarnaan gram (Rohmah, 2017), fisiologisnya dengan uji biokimia (Fitriyah, 2015), maupun struktur secara genetika dengan menggunakan kunci identifikasi 16S RNA yang digunakan untuk identifikasi bakteri (Hatagalung, 2018).

Identifikasi makroskopis meliputi pengamatan terhadap koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media tertentu meliputi bentuk, warna, permukaan dan tepian koloni. Sedangkan untuk pengamatan mikroskopik dilakukan dengan melakukan pewarnaan gram terlebih dahulu, agar diketahui struktur penyusun tubuh bakteri tersebut. Pewarnaan gram merupakan salah satu metode pewarnaan differensial yang menggunakan 2 zat warna untuk mengetahui bakteri termasuk kelompok gram positif atau negatif sehingga berfungsi sebagai kunci determinasi (Pelczar dan Chan, 2008).

Tabel 2.2. Karakterisasi Pewarnaan Gram

	Larutan dan	Reaksi			
Tahapannya		Bakteri Gram Positif	Bakteri Gram Negatif		
1.	Pewarna Kristal violet (UK)	Sel berwarna ungu	Sel berwarna ungu		
2.	Larutan Yodium (Y)	Kompleks UK-Y terbentuk di dalam sel; Sel tetap berwarna ungu.	Kompleks UK-Y terbentuk di dalam sel; Sel tetap berwarna ungu.		
3.	Larutan Alkohol	Dinding sel mengalami dehidrasi, daya serap dinding sel menurun, UK-Y tidak dapat keluar dari sel, Sel tetap ungu.	Lipid Terekstraksi dari dinding sel, pori-pori mengembang, kompleks UK- Y keluar dari sel, Sel tidak berwarna.		
4.	Pewarna Safranin	Sel tak tidak terpengaruh; Sel tetap berwarna ungu.	Sel menyerap zat pewarna ini, sel menjadi merah.		

Sumber: Pelczar dan Chan, 2008.

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 ekologinya. Hubungan antara biokimia dan metabolisme sel adalah terjadinya reaksi kimia pada sel mikroba, bahwa mikroba tersebut dapat meghasilkan 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 Motalitas, Uji MR-VP (Methyl red-Vogos 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):

- 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.

- c. Uji TSIA tujuannya digunakan untuk mengidentifikasi bakteri enterobacteriaceae.
- d. Uji sitrat bertujuan untuk mengetahui bahwa bakteri menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon.
- e. Uji MR (Methyl Red) bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi asam campuran (metil glikon).
- f. Uji VP (Voges Proskuer) bertujuan untuk mengetahui pembentukan asetil metil karbinol (asetonin) dari hasil fermentasi glukosa.
- g. Uji Urease tujuannya untuk mengidentifikasi akteri penghasil enzim urease yang berguna dalam menguraikan urea menjadi ammonia karbondioksida
- h. Uji Hidrolisis pati tujuannya untuk mengetahui apakah bakteri memiliki enzim amilase untuk menguraikan pati.
- i. Uji Fermentasi gula tujuannya untuk mengetahui bakteri dalam fermentasi karbohidrat.
- Uji Ketahanan garam bertujuan untuk mengetahui sifat fisiologi dari mikroba.

2.6 Antibakteri

Antibakteri merupakan suatu senyawa yang bersifat untoleran terhadap pengendalian pertumbuhan dan perkembangan bakteri patogen. Senyawa ini mencegah penyebaran penyakit dan infeksi oleh bakteri patogen dan bersifat toksisitas selektif artinya bersifat toksik pada bakteri patogen tetapi tidak toksik terhadap inangnya. Berdasarkan sifat toksik yang dimiliki, antibakteri

dibagi menjadi bakteriosida (bahan yang membunuh bakteri tapi tidak menyebabkan lisis pada bakteri) dan bakteriostatistik (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: perusakan 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:

- 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. Tidak mengganggu keseimbangan flora normal yang terdapat pada tubuh inang.

Antibiotik diklasifikasikan cara biosintesis dan struktur biokimianya berdasarkan spektrum yakni spektrum luas dan sempit. Antibiotik dengan spectrum sempit hanya dapat menghambat atau membunuh bakteri golongan tertentu seperti kelompok gram positif saja atau negatif saja. sedangkan antibiotik dengan spectrum luas dapat bekerja pada semua jenis bakteri. Pada era sekarang resistensi mikroba terhadap antibiotik mulai ditemukan, sehingga banyak usaha dalam menemukan sumber antibiotik baru yakni dengan cara penapisan secara primer dan sekunder salah satu sumbernya melalui mikroorganisme. Penapisan primer meliputi: mencari sumber penghasil, pengembangiakan mikroba dan menguji kemampuan. Sedangkan tahapan penapisan secara sekunder meliputi: pencarian kondisi identifikasi optimum pertumbuhan mikroorganisme terpilih, mikroorganisme dan identifikasi substansi (Pratiwi, 2008).

Tabel 2.3 Antibiotik yang Diproduksi oleh Mikroorganisme

Mikroorganisme	Antibiotik Aktuvitas		Target	
Penicillium chrysogenum	Penisilin	Bakteri gram positif	Sintesis dinding sel	
Bacillus subtilis	Basitrasin	Bakteri gram positif	Sintesis dinding sel	
Streptomyces rimosus	Tetrasiklin	Spektrum luas	Sitesis protein	
Streptomyces griseus	Streptomisin	Bakteri gram negatif	Sitesis protein	
Penicillium griseofulvum	Griseofulvin	Fungi dermatofitik	mikrotubulus	
Streptomyces nodosus	Amfoterisin B	Fungi	Membrane sel	

(Sumber: Pratiwi, 2008)

2.6.1 Metode Difusi

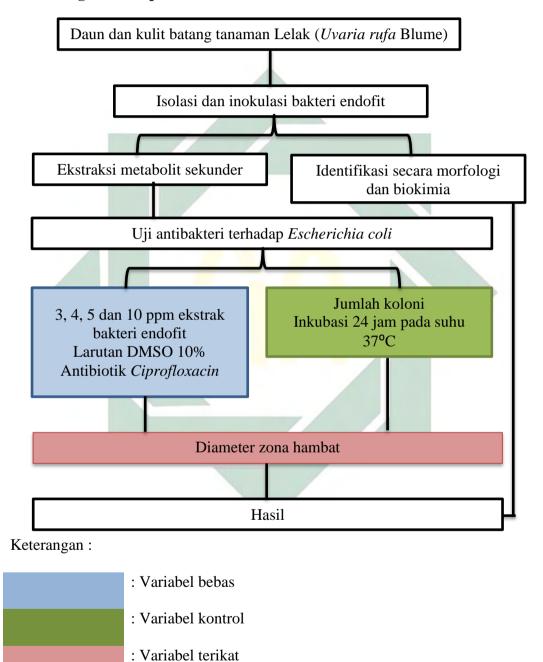
Metode yang digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri secara in vitro salah satunya metode difusi. Metode difusi merupakan cara

pengujian respon obat terhadap bakteri patogen dengan mengamati zona bening yang terbentuk. Metode difusi terbagi menjadi difusi cakram atau menggunakan paper disk yang mengandung antibiotik yang diletakkan pada permukaan media agar padat berisi biakan mikroba uji dan metode sumuran yaitu pembuatan sumur pada media agar padat dan antibiotik dimasukkan melalui sumur yang dibuat, selanjutnya keduanya dilakukan pengukuran diameter zona hambat yang ditandai dengan zona bening disekitar paper disk atau sumuran. Laju difusi antimikroba melalui pelat agar tergantung pada sifat difusi dan kelarutan antibiotik dalam agar dan berat molekul senyawa antibiotik (Nisa, 2018).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



3.2 Hipotesis Penelitian

H0: Tidak terdapat perbedaan aktivitas antibakteri (diameter zona hambat) antara ekstrak isolat bakteri endofit dari tanaman Lelak (*Uvaria rufa* Blume) pada masing-masing konsentrasi terhadap bakteri patogen *Escherichia coli*.

H1: Terdapat perbedaan aktivitas antibakteri (diameter zona hambat) antara ekstrak isolat bakteri endofit dari tanaman Lelak (*Uvaria rufa* Blume) pada masing-masing konsentrasi terhadap bakteri patogen *Escherichia coli*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan pendekatan kuantitatif. Pendekatan kuantitatif meliputi identifikasi isolat bakteri dan uji fitokimia ekstrak bakteri endofit yang disajikan secara tubulasi data dan deskriptif. Serta pengukuran aktivitas antibakteri yang dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dimana masing-masing ekstrak dari isolat bakteri endofit di uji zat antimikroba pada enam perlakuan (konsentrasi 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml,10 mg/ml, kontrol positif menggunakan antibiotik Ciprofloxacin dan kontrol negatif menggunakan larutan DMSO 10 % dengan empat kali ulangan.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan biokimia Terintegrasi, Fakultas Sains dan teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya. Waktu penelitian akan dilaksanakan pada bulan September 2019 - Februari 2020.

Tabel 3.2 Jadwal Pelaksanaan Penelitian

No.	Vaciatan	Bulan						
	Kegiatan	1	2	3	4	5	6	
1	Isolasi dan inokulasi							
1.	bakteri endofit							
2.	Peremajaan Bakteri endofit							
2.	dan bakteri uji							
2	Identifikasi secara							
3.	morfologi dan biokimia							
4	Ekstraksi metabolit							
4.	sekunder bakteri endofit							
5.	Skrining fitokimia ekstrak							
	bakteri endofit							
6.	Uji antibakteri							

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 hypoclorite*, pelarut metanol, pelarut DMSO, *hydrogen peroxide* (H₂O₂), pereaksi wagner, reagen *phenol red*, NaCl 0.9%, 5%, 6.5% dan 10%, *peptone water*, reagen kovac, reagen metil red, alfa naftol, FeCl₃, NaOH 20%, H₂SO₄, BaCl₂, 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,

batang pengaduk, spatula, jarum inokulasi, jarum ose, pisau, kaca preparat, kaca penutup, jangka sorong dan Bunsen.

4.4 Variabel Penelitian

a. Variabel bebas : ekstrak bakteri endofit dan konsentrasi ekstrak

pada uji antibakteri (3,4,5 dan 10 ppm)

b. Variabel terikat : diameter zona hambat (mm)

c. Variabel kontrol : waktu inkubasi, suhu inkubasi, media kultur

bakteri endofit, paper disk dan bakteri uji, reagen

uji biokimia dan uji fitokimia.

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Sterilisasi alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan autoklaf yaitu dengan membungkus peralatan seperti cawan petri, scaple, pinset, tabung reaksi, alat ukur gelas dan Erlenmeyer dengan kertas dan dibungkus dengan plastik tahan panas. Selanjutnya alat dan bahan dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

4.5.2 Teknik Pengambilan sampel

Diambil sampel daun dan batang menggunakan scapel dan pinset steril, dimasukkan pada kantong plastik steril. Sampel segera dibawa ke laboratorium menggunakan *cool box*.

4.5.3 Teknik steril dan aseptik

Selama bekerja di laboratorium selalu gunakan alat pelindung diri (APD) seperti jas laboratorium, masker, sarung tangan karet (*latex*) dan sepatu tertutup. Kerja dilakukan secara aseptik dan steril sesuai prosedur keamanan. Sedangkan tempat kerja, alat dan bahan dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70% sebelum bekerja di dalam LAF.

4.5.4 Pembuatan media

a. Media NA

Media NA digunakan untuk isolasi dan inokulasi bakteri. Media ditimbang sebanyak 20 gram dan dilarutkan 1 liter aquades pada erlenmeyer. Selanjutnya medium dipanaskan dengan hot plate sambil diaduk hingga mendidih dan bening serta ditutup dengan kapas steril dan aluminium foil. Setelah itu dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Kemudian, medium dituang ke dalam cawan petri sebanyak 20 ml dan tabung reaksi sebanyak 5 ml.

b. Media NB

Media NB digunakan untuk ekstraksi metabolit sekunder bakteri. Media ditimbang sebanyak 8 gram dan dilarutkan dengan 1 liter aquades pada erlenmeyer. Selanjutnya medium dipanaskan dengan hot plate sambil diaduk hingga mendidih dan bening serta ditutup dengan kapas steril dan aluminium foil. Setelah itu dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15-20 menit

pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Setelah dingin media dimasukkan ke dalam lemari pendingin dan siap digunakan.

c. Media MHA

Media MHA digunakan untuk pengujian antibakteri. Media ditimbang sebanyak 37 gram dan dilarutkan dengan 1 liter aquades pada erlenmeyer. Selanjutnya medium dipanaskan dengan hot plate sambil diaduk hingga mendidih dan bening serta ditutup dengan kaas steril dan aluminium foil. Setelah itu dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Kemudian, medium dituang sebanyak 20 ml pada cawan petri.

d. Media MIO

Media MIO digunakan untuk identifikasi secara biokimia pada uji motilitas, indol dan uji ornithin. Sebanyak 30 gram dilarutkan pada 100 ml aquades. Selanjutnya medium dipanaskan dengan hot plate sambil diaduk hingga mendidih dan bening. Sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Setelah itu media dituang sebanyak 5 ml pada tabung reaksi dengan posisi tegak.

e. Media SCA

Media SCA digunakan untuk identifikasi secara biokimia pada uji sitrat. Sebanyak 1,5 gram media dilarutkan pada 50 ml aquades. Selanjutnya medium dipanaskan dengan hot plate sambil diaduk hingga mendidih dan bening. Sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Setelah itu media dituang sebanyak 5 ml pada tabung reaksi dan dimiringkan 45° sampai media memadat.

f. Media MR-VP

Media MR-VP digunakan untuk identifikasi secara biokimia pada uji MR (methyl red) dan VP (voges proskeuer).Sebanyak 1,5 gram dilarutkan dalam 100 ml aquades. Selanjutnya medium dipanaskan dengan hot plate sambil diaduk hingga mendidih dan bening. Sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Setelah itu media dituang sebanyak 5 ml pada tabung reaksi dengan posisi tegak.

g. Media fermentasi gula

Media uji terbuat dari glukosa, laktosa, maltosa, mannitol dan sukrosa digunakan untuk identifikasi secara biokimia pada uji fermentasi gula. Media masing-masing sebanyak 1 gr yang dilarutkan ke dalam gelas beker yang telah berisi 100 mL akuades dan ditambahkan pepton water sebanyak 1 gr ke dalam gelas beker. Selanjutnya medium dipanaskan dengan hot plate sambil diaduk hingga mendidih dan bening dan ditambahkan sedikit phenol red. Setelah itu tuang sebanyak 4mL pada tabung reaksi dan masukkan tabung durham serta pemberian label pada masing-masing tabung

reaksi. Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm.

h. Media TSIA

Media ini digunakan untuk identifikasi secara biokimia pada uji TSIA. Sebanyak 6,5 gram media dilarutkan dalam 100 ml aquades dan dipanaskan sampai mendidih. Sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Setelah itu media dituang sebanyak 5 ml pada tabung reaksi dan dimiringkan 45°C sampai media memadat.

i. Media Starch Agar

Media ini digunakan untuk identifikasi secara biokimia pada uji hidrolisis pati. Sebanyak 1 gr starch dan 2 g media NA dilarutkan pada 100 ml aquades, dihomogenkan dan dipanaskan pada hot plate. Sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Setelah itu media dituang sebanyak 20 ml pada cawan petri.

j. Media MRS Broth

Media ini digunakan untuk identifikasi secara biokimia pada uji ketahanan garam. Sebanyak 5,2 gram media dilarutkan pada 100 ml aquades dihomogenkan kemudian dipanaskan pada hot plate dan ditambahkan konsentrasi NaCl 5%, 6.5% dan 10%. Sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C dan

tekanan 2 atm. Setelah itu media dituang sebanyak 5 ml pada tabung reaksi dengan posisi tegak.

k. Media Urea

Media ini digunakan untuk identifikasi secara biokimia pada uji urease. Sebanyak 1,5 gram media dilarutkan pada 50 ml aquades dihomogenkan dan dipanaskan pada hot plate. Sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Setelah itu media dituang sebanyak 5 ml pada tabung reaksi dengan posisi tegak.

4.5.5 Isolasi bakteri endofit

Bakteri endofit yang diisolasi dari daun dan kulit batang tumbuhan liana famili Annonaceae disterilkan pada bagian permukaan. Bagian tumbuhan tersebut dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Kemudian, disterilkan dengan merendam daun dan batang pada larutan alkohol 70% selama 1 menit. Selanjutnya disterilkan lagi dengan merendam pada larutan sodium hypoklorit 4% selama 5 menit dan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali selama 1 menit. Berikutnya daun dan kulit batang yang akan diisolasi dikeringkan dengan kertas saring steril. Setelah kering, dipotong dengan ukuran 1 cm dan diletakkan pada permukaan media NA yang telah dicampur dengan antibiotik ketokenazol dengan posisi bagian yang terpotong ke arah media. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu

ruang selama 3 x 24 jam. Koloni yang tumbuh dari daun dan kulit batang diinokulasi pada media NA sampai diperoleh biakan murni.

4.5.6 Pemurnian dan peremajaan bakteri endofit

Bakteri endofit yang didapatkan dari hasil isolasi kemudian dimurnikan agar mendapat satu jenis isolat. Pemurnian dilakukan dengan membagi cawan petri menjadi empat bagian. Jarum ose dipanaskan pada api Bunsen hingga membara dan biarkan dingin kemudian diambil 1 ose isolat lalu diinokulasikan pada permukaan agar dengan metode streak plate dimulai pada satu ujung lalu panaskan ose pada setiap kuadran berikutnya. Inkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

4.5.7 Identifikasi bakteri endofit

a. Karakter makroskopis

Karakter koloni bakteri endofit hasil isolasi dari daun dan kulit batang tumbuhan liana famili annonaceae diamati koloni yang tumbuh dari bentuk ,elevasi, tepi, dan warna koloni pada bagian atas dan bawah cawan.

- bentuk koloni meliputi bulat, tidak beraturan, berbenang, seperti akar dan filamentous.
- Tepi koloni meliputi rata, berlekuk, bergerigi, filamentus dan berombak (undullate).
- Elevasi meliputi datar, timbul-datar, cembung dan seperti kawah.

4) Warna koloni putih, kuning, hampir bening dan lainnya pada pengamatan atas dan bawah.

b. Karakter mikroskopis

Karakter mikroskopis dilihat dengan menggunakan mikroskop binokuer meliputi bentuk sel bakteri seperti, coccus, basil dan spiral beserta turunannya.

c. Pewarnaan gram

Pewarnaan gram dilakukan selain untuk identifikasi gram positif dan negatif juga sebagai uji pemurnian isolat bakteri secara mikroskopis. Pertama sterilisasi kaca objek dengan alkohol 70%, kemudian dilewatkan pada api bunsen untuk menghilangkan lemak dan ditunggu dingin. Setelah itu diteteskan aquades dan diletakkan 1 ose isolat bakteri murni dan diratakan. Selanjutnya difiksasi dengan melewatkan pada panas api Bunsen. Berikutnya preparat ditetesi dengan pewarna dasar Kristal violet dan ditunggu selama 1 menit. Kemudian dibilas dengan air mengalir selama 5 detik dan diteteskan larutan pengikat warna dasar yaitu lugol selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir lagi. Setelah itu diteteskan alkohol 96% sebagai larutan decolorization selama 45 detik ditunggu kering dan diteteskan pewarna pembanding yaitu safranin selama 1 menit. Kemudian dicuci dan dikering anginkan sebelum diamati pada mikroskop binokuler dan ditambah minyak imersi pada permukaan

preparat selama pegamatan. Bakteri gram negatif akan berwarna merah dan positif akan berwarna ungu.

d. Pewarnaan spora pada bakteri gram positif

Pertama sterilisasi kaca objek dengan alkohol 70%, kemudian dilewatkan pada api bunsen untuk menghilangkan lemak dan ditunggu dingin. Setelah itu diteteskan aquades dan diletakkan 1 ose isolat bakteri murni dan diratakan. Selanjutnya difiksasi dengan melewatkan pada panas api Bunsen. Berikutnya preparat ditutup dengan kertas saring dan ditetesi dengan pewarna Melachit green lalu dipanaskan diatas uap air mendidih selama 5 menit. Kemudian bilas menggunakan air mengalir dan biarkan kering. Berikutnya ditetesi dengan warna pembanding yakni safranin selama 1 menit. Kemudian dicuci dan dikering anginkan sebelum diamati pada mikroskop binokuler dan ditambah minyak imersi pada permukaan preparat selama pegamatan. Spora bakteri akan berwarna hijau kebiruan dan sel vegetative bakteri akan berwarna merah.

e. Uji Biokimia

1) Uji katalase

Pada gelas objek ditetesi aquades dan diberikan 1 ose kultur isolat bakteri berumur 24 jam kemudian ditetesi dengan 30% H₂O₂. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung yang terbentuk.

2) Uji indol

Diinokulasi I ose isolat bakteri pada medium MIO dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu ditetesi 10-20 tetes reagen kovac pada medium tersebut dan diamati hasilnya setelah 30 menit. Uji positif apabila terbentuk cincin berwarna merah dan uji negatif apabila tidak terbentuk cincin berwarna merah.

3) Uji sitrat

Sebanyak 1 ose isolate bakteri di inokulasi secara zig-zag pada permukaan agar miring media *Simmons's Citrate agar* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 29°C. Uji positif ditandai dengan berubahnya warna medium menjadi biru dan uji negatif ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna pada media.

4) Uji MR-VP

Inokulasi 1 ose kultur isolat bakteri murni dengan cara masukkan ose ke dalam tabung reaksi berisi media MR-VP, aduk dengan memutar dan menaik turunkan ose hingga koloni tercampur dengan larutan. Letakkan media pada inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam. Hasil positif pada uji MR adalah terbentuknya warna merah pada medium setelah ditambahkan indikator methyl red untuk MR. Sedangkan hasil positif pada uji VP adalah terbentuknya warna merah pada medium setelah

ditambahkan 40% KOH sebanyak 3 tetes + 5% alfa naftol sebanyak 5 tetes dan dihomogenkan.

5) Uji TSIA

Satu isolat koloni diinokulasikan pada media TSIA dengan cara ditusuk tegak lurus pada bagian buut dan cara zig-zag pada bagian slant, biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jamdan diamati perubahan media.

6) Uji urease

Sebanyak 1 ose isolate bakteri diinokulasi pada media urea selama 24 jam pada suhu 29°C. uji positif ditandai dengan berubahnya warna medium menjadi ungu atau pink magenta dan uji negatif apabila tidak ada perubahan warna

7) Uji hidrolisis pati

Diambil 1 ose isolat bakteri diinokulasikan cawan yang berisi media *Strach Agar*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi ditetesi dengan iodine pada permukaan agar yang berisi isolat. Hasi positif ditandai dengan adanya zona kuning bening disekitar isolat.

8) Uji fermentasi gula

Diambil 1 ose bakteri yang telah tumbuh pada media NA selanjutnya diinokulasi pada masing-masing media gula tersebut dengan memutar dan menaik turunkan ose hingga koloni tercampur dengan larutan. Setelah itu diinkubasi selama

24 jam. Hasil positif pada uji fermentasi gula adalah adanya perubahan warna medium menjadi kuning dan terdapat gelembung udara pada tabung durham.

9) Uji motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan menusukkan satu koloni isolat bakteri ke dalam media MIO kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Hasil possitif ditandai dengan adanya Pertumbuhan bakteri yang menyebar pada media sedangkan hasil negatif apabila pertumbuhan bakteri ada di sekitar tusukan.

10) Uji ketahanan garam

Satu koloni isolat bakteri diinokulasi ke dalam media MRS broth dengan konsentrasi NaCl 5%, 6.5% dan 10%. Kemudian biakan diinkubasi pada suhu 37oC selama 7 hari. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.

11) Uji dekarboksilasi ornithrin

Diinokulasi I ose isolat bakteri pada medium MIO dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu ditetesi 10-20 tetes reagen kovac pada medium tersebut dan diamati hasilnya setelah 30 menit. Uji positif apabila pada daerah anaerob berwarna ungu dan uji negatif apabila terjadi perubahan warna menjadi kuning.

4.5.7 Ekstraksi metabolit sekunder bakteri endofit

Diambil kultur bakteri endofit dari media NA diinokulasikan ke 100 ml media NB dan diinkubasi dan diinkubasi pada suhu 30°C menggunakan shaker inkubator dengan kecepatan 150 rpm selama 48 jam. Kemudian medium biakan bakteri diekstrak menggunakan metode Freeze Drying selama 24 jam pada suhu -50°C untuk mendapatkan ekstrak kering.

4.5.8 Uji fitokimia ekstrak bakter endofit

a. Uji flavonoid

2 ml sampel pada tabung raeksi dipanaskan selama 5 menit pada air mendidih kemudian ditambahkan dengan 0,1 gram serbuk magnesium (Mg) dan ditetesi dengan HCl pekat sebanyak 5 tetes. Warna kuning, jingga hingga merah menandakan positif mengandung flavonoid.

b. Uji alkaloid

2 ml sampel pada tabung raeksi ditetesi dengan HCl pekat sebanyak 3 tetes dan reagen mayer sebanyak 5 tetes kemudian dihomogenkan. Adanya alkaloid ditunjukan dengan terbentuknya endapan putih.

c. Uji saponin

2 ml sampel pada tabung raeksi dilarutkan dengan 2 ml air panas kemudian dikocok hingga berbusa. Hasil positif apabila busa tetap ada selama 10 menit setelah ditetesi dengan setetes HCl pekat.

d. Uji terpenoid

 $2\ ml\ sampel\ pada\ tabung\ raeksi\ ditambahkan dengan <math>3\ tetes$ HCl pekat dan setetes H_2SO_4 pekat. Adanya terpenoid ditandai dengan perubahan larutan menjadi merah atau ungu.

e. Uji steroid

2 ml sampel pada tabung raeksi ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat dan setetes H₂SO₄ pekat. Adanya steroid ditandai dengan perubahan larutan menjadi hijau.

f. Uji Tanin

2 ml sampel pada tabung raeksi dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit dan ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1%. Adanya tannin ditandai dengan perubahan larutan menjadi coklat kehijauan atau biru kehitaman.

4.5.9 Peremajaan bakteri uji

Bakteri uji *Escherichia coli* diremajakan pada media NA, EMB ataupun Mac Conkey dengan menggunakan metode streak secara steril dalam LAF (Laminar Air Flow) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

4.5.10 Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri uji *Escherichia coli* diremajakan pada media NA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian diambil 1 ose

bakteri dilarutkan dalam NaCl 0,9 % di vortex. Selanjutnya pengukuran OD bakteri menggunakan spektrometer dengan panjang gelombang 600 dengan nilai OD 0,08 – 0,1.

4.5.11 Uji antibakteri metode difusi

Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi dengan paper disk diameter 6 mm pada media MHA yang telah sterilkan menggunakan bakteri uji *Escherichia coli*. Sebanyak 1 ml suspensi bakteri dimasukkan kedalam cawan petri dan ditambahkan 20 ml media MHA kemudian dihomogenkan dengan memutar angka 8 dan ditunggu memadat. Kemudian, diletakkan 3 cakram paper disk pada permukaan media dan diatur jarak agar tidak berdekatan, diteteskan 20 µl masingmasing perlakuan. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Eksperimen ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali. Aktivitas antimikroba ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekitar cakram. Selanjutnya dilakukan perhitungan zona hambat dengan jangka sorong. Kemudian dihitung indeks penghambatan berdasarkan rumus:

Diamater Zona hambat = diameter pengukuran - diameter kertas cakram

4.5.12 Pengolahan limbah Media berisi biakan bakteri

Dibersihkan dan dibungkus media dengan plastik tahan panas.

Alat dan bahan (media) didestruksi sampai pada suhu 100°C denagn

hot plate. Setelah itu media dapat dibuang di tempat sampah dan peralatan dicuci dengan detergen dan disterilisasi dengan autoklaf.

4.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan selama penelitian akan analisis menggunakan aplikasi SPSS versi 16.0. Pada Uji antibakteri dilakukan dengan analisis Non-Parametrik menggunakan Uji Kruskall wallis. Sedangkan untuk data identifikasi bakteri endofit dan uji fitokimia akan dianalisis secara deskriptif.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini berjudul "Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Daun dan Kulit Batang Tanaman Lelak (*Uvaria Rufa* Blume) sebagai Zat Antibakteri". Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui bakteri endofit yang dapat diisolasi dari daun dan kulit batang tanaman, memperoleh karakteristik fenotip makroskopik dan mikroskopik bakteri yang kemudian diidentifikasi spesies bakteri melalui beberapa uji biokimia. Selanjutnya bakteri di ekstraksi untuk mendapatkan metabolit sekunder yang diproduksi. Ekstrak dari bakteri endofit kemudian diuji kualitatif melalui penapisan fitokimia. Selanjutnya dianalisis potensinya sebagai zat antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* menggunakan metode difusi.

5.1 Isolasi dan Purifikasi Bakteri Endofit

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun dan kulit batang tanaman *Uvaria rufa* yang diperoleh dari Balai Konservasi Tanaman LIPI-Purwodadi. Proses isolasi bakteri endofit ini, dilakukan dengan mengalirkan air pada organ tanaman dan dilanjutkan dengan sterilisasi permukaan organ tanaman dengan merendam organ tanaman pada larutan alkohol 70% dan larutan hypoklorit 4% yang bertujuan untuk membersihkan kontaminan dari luar. Menurut Pratiwi (2008), larutan alkohol 70% dapat membunuh bakteri dan fungi namun tidak dapat membunuh endospora dan virus non-enveloped sedangkan larutan hipoklorit dengan bahan aktif klorin berpotensi efektif dalam membunuh

bakteri, fungi, endospora maupun virus. Alkohol bekerja dengan mendenaturasi protein mikroorganisme dan melarutkan lipid. Sedangkan asam hipoklorit bekerja dengan mengoksidasi protein membran sel dan menginaktivasi enzim mikroorganisme. Selanjutnya media yang digunakan yaitu media umum NA (*Nutrient agar*) yang ditambahkan dengan antibiotik ketokenazole yang bertujuan agar tidak terdapat jamur yang tumbuh pada permukaan media. Menurut Mulyadi (2013), ketokenazole merupakan obat antifungi golongan azol yang dipakai sejak tahun 1981, mekanismenya yakni mengganggu biosintesis ergosterol sehingga membran sel rusak dan permeabilitasnya meningkat menjadikan sel lisis dan mati. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu ruang selama 3×24 jam. Hasil isolasi bakteri endofit dari daun dan kulit batang tanaman dapat diamati pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Isolasi Bakteri Endofit Tanaman Uvaria rufa

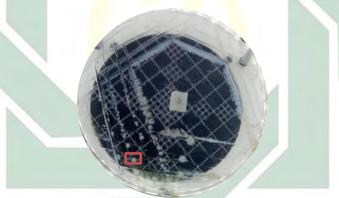
Bagian Tanaman	Media	Jumlah Bakteri	Kode Isolat
Kulit Batang	NA + Ketokenazole 0 % NA + Ketokenazole 0,1 %	1 2 2	2 3 dan 4
Daun	NA + Ketokenazole 0,2 % NA + Ketokenazole 0 % NA + Ketokenazole 0,3 %	1 2	1 dan 5 8 6 dan 7

(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020)

Berdasarkan tabel 5.1 terdapat lima isolat bakteri endofit yang diisolasi dari kulit batang dan tiga isolat dari daun tanaman *Uvaria rufa*. Pada penelitian ini melakukan perbedaan komposisi media isolasi dengan konsentrasi penambahan antibiotik ketokenazol yaitu sebesar 0%, 0.1%, 0.2% dan 0.3%. Pada masing-masing sampel daun dan kulit batang tanaman. Hasil isolasi dari kulit batang tanaman, bakteri endofit diamati tumbuh pada tiga media

perlakuan yaitu pada penambahan antibiotik ketokenazole konsentrasi 0%, 0.1%, 0.2%. Sedangkan pada daun tanaman, bakteri endofit tumbuh pada penambahan antibiotik ketokenazole konsentrasi 0% dan 0.3%.

Bakteri endofit yang tumbuh selanjutnya dipurifikasi untuk mendapatkan isolat tunggal murni menggunakan metode *streak plate* pada gambar 5.1. Koloni tunggal yang diperoleh kemudian diamati secara makroskopis dan mikroskopis menggunakan mikroskop untuk pengamatan mengenai bentuk dan sifat gram isolat bakteri. Kemudian isolat tunggal bakteri endofit dipindahkan ke dalam agar miring sebagai stok yang selanjutnya dapat digunakan untuk tahap karakterisasi secara fisiologis uji biokimia.



Gambar 5.1 Koloni Tunggal Bakteri Metode Streak Plate (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020)

5.2 Karakterisasi Bakteri Endofit

5.2.1 Karakter Makroskopis

Delapan isolat bakteri endofit yang telah dipurifikasi, diamati morfologi koloni meliputi bentuk, tepi, elevasi dan warna. Hasil dari karakterisasi makroskopis dapat diamati pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Karakter makroskopis Bakteri Endofit Tanaman Uvaria rufa

The state of the s							
Isolat	at Bentuk Tepi		Elevasi	Warna			
1	Bulat	Entire	Raised	Putih			
2	Ireguler	Undulate	Raised	Putih			
3	Bulat	Undulate	Raised	Putih			
4	Ireguler	Undulate	Raised	Putih			
5	Ireguler	Undulate	Flat	Putih			
6	Ireguler	Serate	Raised	Putih			
7	Ireguler	Lobate	Raised	Putih			
8	Ireguler	Undulate	Raised	Putih			

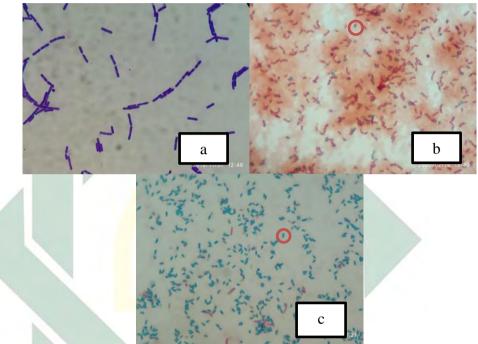
(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020)

Berdasarkan tabel 5.2 pengamatan karakter makroskopis koloni bakteri yang diisolasi dari daun dan kulit batang tanaman *Uvaria rufa*, terdapat perbedaan pada bentuk koloni, tepi koloni dan elevasi (permukaan koloni). Bentuk koloni ada yang bulat dan tidak beraturan (irregular). Tepi koloni ada yang rata (entire), bergelombang (undulate), berlekuk (lobate) dan bergerigi (serate). Selanjutnya untuk permukaan koloni bakteri ada yang flat yaitu koloni sangat tipis hampir rata dengan medium tumbuh tidak ada ketinggian dan raised koloni memiliki tinggi yang nyata terlihat dan memiliki tinggi rata pada seluruh permukaan.

5.2.2 Karakter Mikroskopis

Pengamatan karakter mikroskopis dilakukan menggunakan mikroskop dari hasil pewarnaan gram dan pewarnaan spora. Pada pewarnaan gram dapat diamati bentuk dan jenis bakteri berdasarkan struktur dinding selnya. Pada penelitian ini, semua isolat bakteri endofit berbentuk rods (batang) dengan jenis bakteri gram positif yang ditandai dengan warna ungu (Gambar 5.1). Hal ini menunjukkan bakwa bakteri tersebut memiliki struktur dinding sel

dengan lapisan peptidoglikan yang tebal. Menurut Pratiwi (2008), komponen dinding sel bakteri gram positif tersusun atas lapisan peptidoglikan, asam teikoat dan fosfat, sehingga terbentuk struktur yang kuat dan kaku.



Gambar 5.2 a. Pewarnaan Gram, b. Spora Sperikal dan c. Spora Elipsodial, b dan c. spora berwarna hijau dan sel vegetatif bakteri berwarna merah. (perbesaran 100×10 mikroskop binokuler)
Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020

Setelah itu, untuk identifikasi mikroskopis lebih lanjut maka dilakukan pewarnaan spora untuk membuktikan ada atau tidaknya proses sporulasi atau sporogenesis. Pada penelitian ini semua isolat bakteri dapat memproduksi endospora. Endospora merupakan sel yang tahan terhadap kekeringan, paparan bahan kimia toksik dan radiasi. Sel ini tersusun atas inti, korteks (peptidoglikan tidak saling silang) dan juga selubung protein yang sebagian besar mengandung asam dipikolinat. Endospora terbentuk dari sel vegetatif yang tidak

mungkin hidup dalam kondisi lingkungan yang kurang nutrisi, dan akan kembali ke bentuk sel vegetatifnya apabila terdapat nutrisi yang memadai. Satu sel vegetatif akan membentuk satu endospora yang setelah germinasi akan menjadi satu sel utuh, sehingga proses sporulasi bakteri bukan merupakan proses reproduksi karena tidak meningkatkan jumlah sel (Pratiwi, 2008). Hasil pengamatan karakter mikroskopis mengenai bentuk, reaksi gram dan tipe spora dapat diamati pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 Karakter Mikroskopis Bakteri Endofit Tanaman Uvaria rufa

Isolat	Bentuk	Gram	Spora	Tipe
 1	Batang	Positif	ada	Elipsodial
2	Batang	Positif	ada	Elipsodial
3	Batang	Positif	ada	Elipsodial
4	Batang	Po <mark>siti</mark> f	ada	Elipsodial
5	B <mark>atan</mark> g	Positif	ada	Sperikal
6	Batang	Positif	ada	Sperikal
7	B <mark>atan</mark> g	Positif	ada	Elipsodial
8	Batang	Positif	ada	Elipsodial

(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020)

Berdasarkan tabel 5.3 pengamatan karakter mikroskopis semua isolat bakteri memiliki bentuk batang dan tergolong bakteri gram positif. Serta pengamatan adanya spora bakteri, pada penelitian ini diamati ada tipe spora yaitu bentuk elipsodial (bentuk elips) dan sperikal (menyerupai bulat).

5.2.3 Karakterisasi Biokimia

Karakterisasi biokimia merupakan pengamatan terhadap sifat fisiologis bakteri yang meliputi proses metabolisme bakteri pada media determinasi saat pertumbuhan bakteri. Hasil dari uji biokimia dapat diamati pada tabel 5.4.

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	-	-	1	-	-	-	-	-
Indol	-		e -	-	-	-	-	-
ornithin	+	- 1	-	+	+	+	+	-
Hidrolisis pati	+	+	+ _	+	_	-	+	+
TSIA	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	A	K/A	K/A
H_2S	/ / <u>-</u>	+	<i>[-</i>	-	-	-	_	-
Nacl 5 %	-	- ·	-	+	_	-	-	-
Nacl 6.5 %	- /	-	-	-	-	-0	-	-
Nacl 10 %	1	-	-	-	-	-	2	-
sitrat	-	-	-	-	-	/-	-	-
Fermentasi								
glukosa	-	-	+	-	+	-	-	+
sukrosa	-	-	+	-	-	-	7-6	-
Laktosa	-	-	- 1	-	-	-	-	- /
maltosa	+	+	-	-	+	-	-	+
mannitol	-	-	-	-	-	-	-	- ·

(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020)

Karakteristik fisiologis mikroorganisme dapat diketahui dengan melakukan beberapa uji biokimia untuk mempelajari aktivitas metabolisme dan reaksi enzimatis melalui interaksi zat metabolit yang diproduksi dengan Sehingga diketahui reagen kimia. kemampuan 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, suksimat, 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-Proskeuer) 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 ((NH₂)₂CO) menjadi ammonia (NH₃) 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 (H₂O₂) 3% pada isolat bakteri. Adanya aktivitas enzim katalase ini berfungsi untuk mengkatalis suatu pertahanan saat bakteri berada pada lingkungan aerob, beberapa memproduksi dimana bakteri zat toksik menghacurkan organel selnya, seperti hydrogen peroksida (H₂O₂) dan superoksida (O₂) dari hasil metabolismenya sendiri, sehingga zat tersebut

harus diuraikan dengan memproduksi oksigen agar tetap hidup pada linkungan 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 menunjukkkan 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 sisntesis 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

toleran terhadap media dengan konsentrasi Nacl 5%. Sedangkan tidak ditemukan pada isolat lain di konsentrasi lain yang menunjukkan pertumbuhan mikroba.

Berdasarkan karakteristik morfologi dan biokimia ditemukan 8 isolat yang memiliki karakteristik mikroskopis dan makroskopis serta fisiologis yang beragam. Hal ini menunjukkan kesempurnaan kekuasaan Allah sebagai pencipta, segala apa yang ada di bumi dengan beragam jenisnya bahkan pada mikroorganisme yang tidak terlihat secara langsung. Sesuai dengan kalamullah Q.S An-Nahl (16) ayat 13 sebagai berikut:

"Dan Dia menundukkan pula apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berlain-lain macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda kekuasaan Allah, bagi kaum yang mengambil pelajaran."

Melalui ayat tersebut juga dijalaskan bahwa adanya keberagaman penting untuk dipelajari. Sehingga setelah mendapatkan karakter pembeda yang diadapat kemudian dilakukan identifikasi agar diketahui jenis dari bakteri endofit yang diioslasi dari daun dan kulit batang tanaman *Uvaria rufa*.

5.3 Identifikasi Genus Bakteri Endofit

Identifikasi isolat bakteri endofit dari tanaman *Uvaria rufa*, berdasarkan karakteristik secara makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia, diduga bahwa semua isolat bakteri endofit yang ditemukan masuk pada kelompok

marga yang sama yakni *Bacillus* spp. Pada tabel 5.5 karakteristik identifikasi Genus *Bacillus* melalui persamaan karakteristik mikro dan makroskopis serta beberapa uji biokimia yang dilakukan.

Tabel 5.5 Karakteristik Identifikasi Genus Bacillus

Karakteristik	Genus Bacillus
Bentuk	Rods
Reaksi Gram	Positif
Ukuran	
0.5–1.0 mm	+
1.0 or >1.0 mm	
Motilitas	+/-
Spora	+
Bentuk spora	
Elipsodial	+
Sperikel	+
Aerobic	+
Anaerobic fakultatif	+
Tumbuh pa <mark>da media</mark> NaCl	
0%	+
5%	+
10%	+
20%	+
Tumbuh <mark>pad</mark> a Ph	
5	+
6	+
7	+
8	+
9	+
10	- A
Katalase	+/-
Oksidase	+/-
MR	+/-
VP	+/-
Urease	+/-
Indol	-
Hidrolisis pati	+/-
Sitrat	-
Fermentasi	
Glukosa	+/-
Sukrosa	+/-
Laktosa	+/-
maltosamaltose	+/-
Mannitol	+/-

^{+ :} setidaknya satu spesies dalam genus memberikan reaksi positif

(Sumber: Vos, Paul De et.al, 2009)

^{+/-:} beberapa spesies positif, beberapa spesies negatif

^{- :} negatif

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 pengelompokkan bakteri bacil gram positif terdiri dari bakteri pembentuk spora (spesies *Bacillus*, *Clostridium*), dan apabila tidak membentuk tergolong kelompok (Listeria, Erysipelothrix, Corynobacterium, spora 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 mengunakan 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	Ekstrak Isolat Bakteri							
Fitokimia	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 macaebo 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 tedeteksi senyawa metabolit sekunder tannin pada jam fermentasi yang terlalu pendek. Sehingga mengindikasikan bahwa belum tersintesis atau jumlahnyanya 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 kaliumalkaloid. 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 beikatan 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 FeCl₃, digunakan untuk mendeteksi senyawa fenol, dengan adanya ikatan ion Fe³⁺ sebagai atom pusat yang akan berikatan dengan atom O pada tannin yang memiliki pasangan elektron bebas

sehingga terbentuk ligan. ion Fe³⁺ akan berikatan dengan 2 tannin yang memiliki 2 atom donor yaitu atom O pada posisi 4' dan 5' dihidroksi, sehingga terdapat 6 pasangan elektron bebas yang berikatan dengan atom pusat (Ergina, 2014).

Berdasarkan penapisan fitokimia secara kualitatif pada ekstrak bakteri endofit, dideteksi adanya kandungan metabolit sekunder yaitu, flavonoid, alkaloid, saponin dan tannin. Hal tersebut dikatahui bahwa semua apa-apa yang diciptakan oleh Allah adalah baik dan pasti terselip tujuan tertentu mengapa menciptakan sesuatu, karena sesuatu tersebut memiliki nilai kemanfaatan yang dapat diterapkan dalam menjalani kehidupan sehari-hari. Sesuai dengan Q.S Ali-Imran (3) ayat 191 menjelakan bahwa:

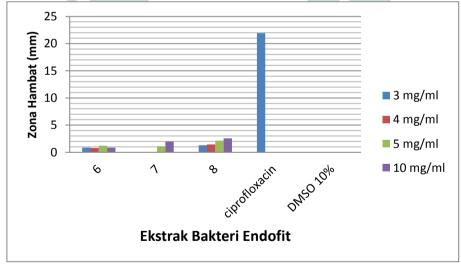
"yaitu orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia. Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka."

Hasil penapisan fitokimia ekstrak dari bakteri endofit diketahui memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan seperti antibakteri. Sehingga hal tersebut membuat kita sadar akan nikmat Allah yang begitu banyak, agar kita menjadi pribadi yang bersyukur atas segala sesuatu yang telah dikaruniakan. Serta dengan adanya penelitian mengenai pencarian obat baru dari suatu penyakit, dapat dijadikan bekal agar senantiasa

menjaga kebersihan dan kesehatan. Selanjutnya ekstrak kering dari bakteri endofit yang diperoleh diuji potensinya dalam aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji.

Uji aktivitas antibakteri

Pada penelitian ini, ekstrak bakteri endofit diuji potensinya terhadap patogen *Escherichia coli* mengunakan metode difusi. Setiap ekstrak dilarutkan menggunakan larutan DMSO 10% pada konsentrasi 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml dan 10 mg/ml. Kontrol positif menggunakan antibiotik ciprofloxacin sedangkan pelarut DMSO sebagai kontrol negatifnya. Menurut Habibi dkk (2017), penggolongan diameter zona hambat <5mm menandakan lemah, zona hambat 6-10 mm menandakan sedang, zona hambat 11-20 mm menandakan kuat dan apabila > 20 sangat kuat. Semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk pada uji antibakteri maka semakin baik. Hasil dari uji aktivitas antibakteri dapat diamati pada gambar 5.3



Gambar 5.3 Nilai rata-rata diameter zona hambat dari ekstrak bakteri endofit beserta kontrol positif dan negatif
Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020

Berdasarkan pengamatan pada gambar 5.3 semua ekstrak bakteri endofit di semua konsentrasi menunjukkan aktivitas antibakteri lemah terhadap patogen

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 sisntesis 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 penelitianya 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

didapatkan metabolit sekunder terbaik yang dapat menghambat bakteri uji, hasilnya metabolit sekunder pada jam ke-38 memiliki potensi terbesar daripada metabolit sekunder pada jam lainnya. Sehingga perlunya optimasi pada waktu fermentasi agar metabolit sekunder yang dihasilkan maksimal. Selain itu pada penelitian Fitriana dan Rusli (2018), melakukan pengujian pemberian metabolit sekunder hasil fermentasi bakteri Actinomycetes secara berkala setiap hari selama 28 hari terhadap beberapa bakteri uji dan dilihat nilai pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa metabolit sekunder dari bakteri Actinomycetes memiliki perbedaan pengaruh zona hambat terhadap masing-masing bakteri uji yang dipengaruhi oleh waktu fermentasi. Sehingga dapat diketahui durasi fermentasi terbaik dalam menghasilkan zona hambat optimum setiap bakteri uji pada pemberian ekstrak metabolit sekunder dari Actinomycetes. Berdasarkan pada penelitian Budiarti, Fitriana dan Rusli (2018) dapat disimpulkan bahwa setiap bakteri memiliki fase pertumbuhan yang berbeda-beda sehingga perlu dilakukan pengukuran kurva pertumbuhan pada setiap bakteri, selain itu efektivitas antibakteri juga ditentukan oleh jenis bakteri uji. Berikutnya analisis data hasil dari uji kruskal wallis yang dapat diamati pada tabel 5.7 dan 5.8.

Tabel 5.7 Analisis Hasil Aktivitas Antibakteri pada Setiap Ekstrak

Perlakuan	Rata-rata	P (value)	df	Chi-Square
ekstrak 1	66.38			
ekstrak 2	83.19			
ekstrak 3	66.12			
ekstrak 4	88.94			
ekstrak 5	58.88	.000	9	56.921
ekstrak 6	35.47			
ekstrak 7	46.16			
ekstrak 8	101.88			
kontrol positif	134.50			
kontrol negatif	6.50			
Kontrol liegatii	0.50			

(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020)

Berdasarkan nilai rata-rata pada tabel 5.7 maka tingkat efektivitas ekstrak bakteri endofit yang memiliki daya hambat paling tinggi ke rendah adalah dimulai dari kontrol positif diikuti oleh ekstrak 8, ekstrak 4, ekstrak 2, ekstrak 1, ekstrak 3, ekstrak 5, ekstrak 7, ekstrak 6 dan kontrol negatif. Selanjutnya untuk pengujian hipotesis dapat dilakukan membandingkan nilai chi square hitung dengan chi-square tabel atau melalui perbandingan nilai pvalue dengan galatnya (0,05). Perhitungan hasil chi square diperoleh nilai chi suare hitung > chi square tabel (56,921 > 16,919) maka H0 ditolak dan Ha diterima. Begitu juga dengan nilai p-value < 0.05 (0.00 < 0.05) maka H0 ditolak dan Ha diterima. Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan dimana terdapat perbedaan efektivitas antibakteri (diameter zona hambat) antara ekstrak isolat bakteri endofit dari tanaman Lelak (*Uvaria rufa* Blume) terhadap bakteri patogen *Escherichia coli*. Selanjutnya untuk analisis perlakuan konsentrasi antara ekstrak bakteri endofit dapat diamati pada tabel 5.8.

Tabel 5.8 Analisis Hasil Aktivitas Antibakteri pada Setiap Konsentrasi

Perlakuan	Rata-rata	P (value)	df	Chi-Square
3 mg/ml	42.66	.000	5	55.678
4 mg/ml	58.25			
5 mg/ml	75.03			
10 mg/ml	97.56			
ciprofloxacin	134.50			
DMSO	6.50			

(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2020)

Berdasarkan nilai rata-rata pada tabel 5.8 maka tingkat efektivitas masing-masing konsentrasi ekstrak bakteri endofit yang memiliki daya hambat paling tinggi ke rendah adalah dimulai dari kontrol positif diikuti oleh konsentrasi 10 mg/ml, 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml dan kontrol negatif. Selanjutnya untuk

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 suare hitung > chi square tabel (55,678 > 11,070) maka H0 ditolak dan Ha diterima. Begitu juga dengan nilai p-value < 0.05 (0.00 < 0.05) maka H0 ditolak dan Ha 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 chanel 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

dan menginaktifkan enzim untuk metabolisme sehingga sel akan mati. Tannin mempengaruhi membran sel mikroba dengan pengikatan ion H⁺ kepada gugus polar (gugus fosfat) pada membran sel bakteri, sehingga molekul fosfolipid akan terurai menjadi asam fosfat, gliserol dan asam karboksilat yang menyebabkan lilisnya membrane sel bakteri. Selain itu melalui dan pengikatan ion logam Fe²⁺ dengan tannin yang mengakibatkan enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase pada bakteri tidak terbentuk, sehingga proses multiplikasi bakteri tidak terjadi (Mufti dkk 2017 dan Budiarti, 2018).

Suatu penyakit timbul karena ada beragam faktor pemicunya, namun segala penyakit pasti ada obatnya. Sesuai dengan firman Allah pada Q.S As-Syura (42) ayat 80:

"dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku"

Rasa sakit adalah suatu kondisi lemah dimana penurunan sistem kekebalan tubuh dan akan berakibat pada aktivitas yang dijalankan. Tidak semua sakit adalah musibah, sakit bisa menjadi nikmat yang bisa diambil hikmahnya. Sehingga kita belajar menerapkan bagaimana cara hidup sehat dan bersih. Selain untuk diri sendiri juga saudara kita yang lainnya. Berikut firman Allah, salah satu penyebab menjadi sakit Q.S. Abasa (80) ayat 24:

"Maka hendaklah manusia itu memperhatikan makanannya"

Salah satu penyebaran penyakit adalah melalui makanan yang kurang higienis dan belum matang sehingga terdapat bibit penyakit yang hinggap. Salah satunya peristiwa *foodborne disease* (penyakit bawaan makanan), yaitu makanan yang terkontaminasi oleh mikroba atau zat kimia mulai dari tahap produksi, distribusi hingga saat dikonsumsi, sehingga berdampak pada kesehatan kita seperti penyakit diare yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli*, keracunan makanan dan hal lainnya. Penerapan perilaku hidup sehat dan bersih harus dilakukan agar senantiasa terhindar dari penyakit yang berbahaya.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 KESIMPULAN

Berdasarkan penelitan yang dilakukan, dapat diisimpulkan bahwa:

- a. Ada 8 isolat bakteri endofit yang dapat diisolasi dari tanaman *Uvaria rufa*, 5 isolat dari kulit batang da 3 isolat dari daun. Semua bakteri berbentuk rods dan memiliki spora, berdasarkan uji biokimia, isolat yang ditemukan diduga sekelompok marga dari *Basillus* spp.
- b. Hasil dari penapisan fitokimia ekstrak isolat bakteri endofit mengandung metabolit sekunder yang berbeda. Semua esktrak positif megandung flavonoid. Sedangkan kandungan alkaloid tidak ditemukan pada ekstrak
 3. Kandungan saponin terdapat pada ekstrak
 3.5,6 dan 8 serta kandungan tannin pada ekstrak 1.
- c. Berdasarkan uji ekstrak bakteri endofit sebagai zat antibakteri terhadap patogen *Escherichia coli* terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan berdasarkan jenis ekstrak dan konsentrasi. Hasilnya semua ekstrak memiliki aktivitas antibakteri yang tergolong lemah, zona hambat terbesar diperoleh dari ekstrak 8 dengan rata-rata sebesar 101,88 serta pada konsentrasi 10 mg/ml yaitu dengan rata-rata sebesar 97.56.

6.2 SARAN

Penulis menyarankan agar perlunya penelitian lebih lanjut untuk identifikasi isolat bakteri endofit berdasarkan genetik. Optimasi produksi metabolit sekunder oleh isolat endofit melalui pengukuran kurva

pertumbuhan bakteri. Serta adanya kandungan metabolit sekunder yang dideteksi perlu uji lebih lanjut untuk efektivitasnya terhadap patogen lain. Pada penelitian ini belum diketahui serotip dari bakteri uji *Escherichia coli*, sehingga dimungkinkan memiliki aktivitas penghambatan yang berbeda pada jenis yang lain.



DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, Eva., Funsu Andiarna, Nova Lusiana., Risa Purnamasari dan Moch. Irfan Hadi. 2018. Identifikasi Senyawa Aktif dari Ekstrak Daun Jambu Air (*Syzygium aqueum*) dengan Perbandingan Beberapa Pelarut pada Metode Maserasi. *Jurnal Biotropic*. Vol.2 (2): 108-118.
- Anggraito, Yustinus Ulung., R. Susanti., Retno Sri Iswari., Ari Yuniastuti., Lisdiana., Nughrahaningsih., Noor Aini Habibah dan Siti Harnina Bintari. 2018. *Metabolit Sekunder dari Tanaman: Aplikasi dan Produksi*. Universitas Negeri Semarang Press, Semarang.
- Bhore SJ, Sathisha G. 2010. Screening of endophytic colonizing bacteria for cytokinin-like compounds: crude cell-free broth of endophytic colonizing bacteria is unsuitable in cucumber cotyledon bioassay. *World J. Agric. Sci.* Vol.6 (4): 345-352.
- Budiarti, Eka Chlara. 2018. Aktivitas Antibakteri dari Metabolit Sekunder Bakteri Endofit F3-B Daun Pepaya (*Carica papaya* L.). *Skripsi*. Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Dai, Do Ngoc., Tran Minh Hoib, Tran Dinh Thange and Isiaka A. Ogunwande. 2012. The Leaf Essential Oils of Five Vietnamese Desmos Species (Annonaceae). *Journal of Natural Product Communication*. Vol. 7(2): 231-234.
- Deroin, Thierry and Mervyn lotter. 2013. A new *Uvaria* L. species (Annonaceae) from northern Mozambique. Journal of Adansonia. 35 (2): 227-234.
- Ergina., Siti Nuryanti dan Indarini Dwi Pursitasari. 2014. Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) yang di Ekstraksi dengan Pelarut Air dan Etanol. *Jurnal Akademika Kimia*. Vol.3 (3): 165-172.
- Fadilah, Titik., Amelia., Ace Baehaki dan Herpandi. 2016. Aktivitas Reduksi Merkuri pada Bakteri yang Diisolasi dari Air dan Sedimen Air Sungai Musi. Jurnal Teknologi Hasil Perikakan. Vol.5 (1): 94-106.
- Fitriana dan Rusli. 2018. Penentuan Waktu Optimum Produksi Metabolit Sekunder Isolat Bakteri *Actinomycetes* dari Tanah Rhizozfer Akar Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal As-Syifaa*. Vol 10 (1): 74-82.
- Fitriyah, Nur Lailli. 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari rumput Kebar (*Biophytum* sp.) Sebagai Penghasi Senyawa Antibakteri terhadap

- bakteri *Esherichia coli* dan *Staphylococcus aureus Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Habibi, Ahmad Ikhwan. 2017. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak n-Heksan Korteks Batang Salam (*Syzygium polyanthum*). *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Walisongo, Semarang.
- Habibi, Ahmad Ikhwan., R. Arizal Firmansyah dan Siti Mukhlishoh Setyawati. 2018. Skrining Fitokimia Ekstrak N-Heksan Korteks Batang Salam (Syzygium polyanthum). Indonesian Journal of Chemical Science. Vol. 6 (2): 1-4.
- Hatmanti, Ariani. 2000. Pengenalan *Bacillus* spp. *Jurnal Oceana*. Vol.25 (1): 31-41.Pattuju, Sarah Mariana., Fatimawali dan Aeltje Manampiring. 2014. Identifikasi Bakteri Resisten Merkuri pada Urine, Fases, dan Kalkulus Gigi pada Individu di Kecamatan Malalayang, Manado, Sulawesi Utara. Jurnal e-Biomedik. Vol.2 (2): 532-540
- Hoa-hua, Li., Zhou Yan-yan., Chen Yu-chan., Sun Zhang-hua., Yan Han-jing., Guo Xiao-Ling and Zhang Wei-min. 2016. A New Isocoumarin Isolated from Endophytic Fungus Arthrinium sp.A092 Derived from Medical Plant *Uvaria microcarpa*. Journal of Chinese Traditional and Herbal Drugs. 1(1).
- Hutagalung, Wilda. 2008. Isolasi dan Uji Efektifitas Bakteri Endofit dari Tumbuhan Jeringau (*Acorus calamus* L.) dalam Menghambat Pertumbuhan Beberapa Mikroba Patogen. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Julianto, Tatang, Shabur. 2019. Fitokimia (Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia). Universitas Islam Indonesia Press, Yogyakarta.
- Junaedi, Abdus Salam. 2017. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit Diazotrof Pelarut Fosfat Penghasil hormon Pertumbuhan *Indole Acetid Acid* (IAA) dari Akar Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill var. tymoti). *Tesis*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Karim, Suhrah Febrina. 2014. Uji Aktivitas Infusa Daun Srikaya (*Annona squamosal* L.) terhadap Penurunan Kadar Asam Urat dalam Darah Mencit (*Mus musculus*). *Skripsi*. Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Alauddin, Gowa.
- Khotimah, Khusnul. 2016. Skrining Fitokimia dan Identifikasi Metabolit Sekunder Senyawa Karpain Pada Ekstrak Metanol Daun *Carica pube*scens Lenne & K. Koch dengan LC/MS (*Liquid Chromatograph-tandem mass*

- *Spectrometry*). *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Koudokpon,H., N. Armstrong., T. V. Dougnon., L. Fah,., E. Hounsa., H. S. Bankolé., F. Loko., E. Chabrière and J. M. Rolain. 2018. Antibacterial Activity of Chalcone and Dihydrochalcone Compounds from *Uvaria chamae* Roots against Multidrug-Resistant Bacteria. *Journal of Hindawi*. Vol. 1(1): 1-10.
- Kusumawati, Dwi Endah., Fachriyan Hasmi Pasaribu dan Maria Bintang. 2014. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit dari Tanaman Miana terhadap *Esherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Journal of Current Biochemistry*. Vol. 1 (1): 45 50.
- Lestari, D.A. 2017. Analisis Hubungan Kekerabatan Annonaceae dari Jawa Timur Koleksi Kebun Raya Purwodadi Berdasarkan Karakter Morfologi dan Penanda Molekuler DNA (*rbcL*, *matK* dan *trnL-F*). *Tesis*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Malang.
- Lestari, Wdya., Dwi Suryanto dan Erman Munir. 2017. Isolasi dan Uji Antifungal Ekstrak Metanol, Etil Asetat dan N-Heksana Bakteri Endofit dari Akar Tumbuhan Mentigi (Voccinium voringaefolium). Jurnal Biosains. Vol. 3 (3): 167-177.
- Macaebo, Allan Patrick G, Florie A Tudla, Karsten Krohn, Scott G Franzblau. 2012. Antitubercular activity of the semi-polar extractives of *Uvaria rufa*. *Journal of Tropical Medicine Elsevier*. 777-780.
- Melliawati, Ruth dan sufinah. 2017. Mikroba Endofit dari Tanaman Srikaya (Annona squamosa L.) sebagai Penghasil Antimikroba Staphylococcus aureus dan Candida albicans. Jurnal Biologi. 16 (1): 69-83.
- Melliawati, Ruth., Dian Noverita Widyaningrum, Apridah Camelia Djohan dan Harmastini Sukiman. 2006. Pengkajian Bakteri Endofit Penghasil Senyawa Bioaktif untuk Proteksi Tanaman. *Jurnal Biodiversitas*. Vol. 7 (3): 221-224.
- Mufti, Natasha., Elizabeth Bahar dan Dessy Arisanti. 2017. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sawo terhadap Bakteri *Escherichia coli* secara *In Vitro*. *Jurnal Kesehatan Andalas*.Vol.6 (2): 298-294.
- Mulyadi, Andi Ujianti Ratu. 2013. Perbandingan daya hambat minimaKetokenazole secara in vitro terhadap Isolat Spesies Malassezia pada Penderita Pitiriasis Versikolor di Makassar. *Tesis*. Program Studi Biomedik, Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu, Universitas Hasanuddin, Makassar.

- Nisa, Khoirun. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Fungi Endofit dan Ekstrak Daun dari Chromolaena Odorata terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae*. *Skripsi*. Fakultas Sais 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 PutihTerhadap 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, Fases, 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, Syilvia 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, Cirendeu, 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 Multidrugs Resistence* 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 (CaCO₃) 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., Nijsiri Ruangrungsi 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.