

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS

2.1. Tinjauan Pustaka

2.1.1. *Eco-enzyme*



Gambar 1. Eco-enzyme
(Sumber: Dokumentasi Pribadi)

Eco-enzyme merupakan larutan organik yang terbuat dari limbah sampah organik segar, yang kemudian difermentasi dengan gula dan air (Rochyani et al., 2020). Bahan organik yang digunakan sebagai komponen utama dalam pembuatan *eco-enzyme* adalah limbah sisa kulit dan ampas dari sayuran dan buah yang masih segar. Ciri fisik *eco-enzyme* sempurna adalah warna coklat tua kekuningan dengan aroma asam yang kuat dan segar (Mahdia et al., 2022).

Pembuatan *eco-enzyme* membutuhkan waktu setidaknya 3 bulan dan hasil akhir dari *eco-enzyme* berupa penumpukan yang dapat digunakan sebagai zat antibakteri. Asam alami dalam *eco-enzyme* menguntungkan untuk mencegah pertumbuhan bakteri. Asam alami dalam *eco-enzyme* ini bersifat korosif laktat dan korosif asetat (Utami,

2020). Selain itu, asam alami juga berperan dalam menurunkan pH sehingga dapat menyulitkan mikroba untuk hidup lebih lama.

Proses fermentasi dapat berupa perubahan kimiawi pada bahan alami (substrat) di mana mikroorganisme melakukan proses kimiawi seperti menghasilkan karbon dioksida dan alkohol, yang menyebabkan perubahan alami. Bahan-bahan yang digunakan dalam persiapan fermentasi adalah sayuran segar dan sisa-sisa kulit buah segar, gula molase dan air. Proses fermentasi ini dalam fase anaerobik yang biasanya mengandung komponen *eco-enzyme* seperti sisa-sisa sayuran dan buah dengan didukung oleh sistem metabolisme bakteri (Larasati et al., 2020).

Fermentasi berlangsung karena adanya perubahan karbohidrat menjadi asam volatil, asam alami yang hancur dalam bahan limbah membentuk senyawa fermentasi karena pH enzim limbah bersifat asam. Enzim limbah yang bersifat asam dapat mengurangi dan menghambat patogen, sehingga enzim limbah memiliki kontrol yang paling baik. Keasaman limbah organik dapat menolong proses pemisahan limbah organik menjadi senyawa dalam proses fermentasi.

Proses fermentasi memecah glukosa menjadi asam piruvat. Dalam kondisi anaerobik, piruvat dekarboksilase memecah asam piruvat menjadi asetaldehida, setelah itu alkohol dehidrogenase mengubah asetaldehida menjadi etanol dan karboksil oksida. *Acetobacter* mengubah alkohol menjadi asetaldehid dan air, kemudian

pada saat itu dipecah kembali menjadi asam asetat (Supriyani et al., 2020). Waktu fermentasi *eco-enzyme* biasanya 3 bulan. Pada bulan pertama setelah pembuatan, alkohol dikeluarkan sehingga ada aroma masam alkohol dari larutan. Pada bulan kedua hingga ketiga, aroma masam mulai muncul karena asam asetat terbentuk bersamaan dengan senyawa-senyawa yang terurai membentuk enzim seperti mineral dan vitamin. Setelah fermentasi, produk *eco-enzyme* mempunyai pergerakan mikroba yang tinggi dan dapat digunakan untuk menekan pertumbuhan mikroba.

Enzim dalam fermentasi *eco-enzyme* mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen karena enzim tersebut dapat mempercepat reaksi biokimia. Enzim-enzim tersebut antara lain amilase, tripsin dan lipase (Rochyani et al., 2020). Produk *eco-enzyme* mempunyai banyak kegunaan dalam hal kesehatan, kebersihan, pertanian dan lingkungan. Menurut Megah (2018), *eco-enzyme* dimanfaatkan untuk cairan pembersih seperti cairan cuci piring, pembersih lantai, pengganti deterjen untuk pakaian, sabun untuk mandi, sampo untuk rambut atau dapat dicampurkan dengan air untuk desinfektan. Pada bidang kesehatan *eco-enzyme* digunakan untuk menyembuhkan dan mencegah gangguan kulit. Bidang pertanian *eco-enzyme* dimanfaatkan sebagai pestisida dan kompos. Keunggulan *eco-enzyme* dalam kaitannya dengan pelestarian lingkungan adalah meminimalisir pencemaran lingkungan yang menyebabkan pencemaran udara sekitar. Antimikroba dalam *eco-*

enzyme dapat mencegah tumbuhnya mikroba pembusuk pada buah atau sayur dengan cara disemprotkan pada permukaan bahan organik (Utami, 2020).

2.1.2. Bakteri

Bakteri merupakan organisme sel tunggal (prokariot) yang tidak mempunyai membrane inti sel dan uniseluler. Bakteri masuk kedalam mikroorganisme akibat ukurannya yang kecil sehingga hanya bisa dilihat dengan mikroskop. Ukuran bakteri beragam yaitu mulai dari diameter 0,12-5 mikron. Menurut Sujadi (2006) bakteri dapat bertahan di beberapa keadaan dengan lingkungan bersuhu tinggi 60°C atau lebih. Bakteri terdiri dari dinding sel, membran plasma, sitoplasma, ribosom, kapsul, flagella, vakuola, dan endosperma.

Fase pertumbuhan bakteri dibagi menjadi empat yaitu fase lag, fase log, fase stasioner, dan fase kematian (Putri, 2017). Berikut fase pertumbuhan bakteri:

1. Fase lag

Tahap ini berlangsung dari sekitar 5 menit hingga beberapa jam, di mana bakteri beradaptasi dengan keadaan lingkungan sekitar media. Proses penyesuaian dalam tahap ini diakibatkan adanya faktor-faktor seperti lingkungan media pertumbuhan dan banyaknya inokulum. Bakteri memerlukan penyesuaian untuk mensintesis enzim. Tahap ini terjadi secara perlahan ketika kultur

bakteri dipindahkan ke medium yang mengandung nutrisi yang terbatas dibandingkan pada medium sebelumnya.

2. Fase log

Pada tahap ini, sel bakteri mengalami mitosis yang bekerja sangat cepat yaitu mengubah kondisi alami bakteri seperti pH, suhu dan nutrisi. Kecepatan pertumbuhan bakteri sangat dipengaruhi oleh media tumbuhnya. Dibandingkan dengan tahap lainnya, pada fase log dibutuhkan energi yang cukup tinggi. Tahap terakhir fase log, bakteri mengalami penurunan kecepatan pertumbuhan karena beberapa faktor diantaranya yaitu berkurangnya nutrisi dan racun dalam hasil metabolisme sehingga menghambat perkembangan bakteri.

3. Fase stasioner

Kepadatan maksimal sel dimana jumlah kematian sel sama dengan jumlah sel tumbuh terjadi pada tahap stasioner ini. Bakteri masih melakukan mitosis sel sekalipun dalam keadaan krisis nutrisi sehingga hasil mitosis sel bakteri memiliki ukuran lebih kecil dan susunan sel yang beragam dari pada sel yang berkembang dalam tahap sebelumnya, khususnya tahap logaritmik. Sel-sel yang berkembang pada tahap ini lebih tahan atau kebal terhadap kondisi lingkungan berlebihan.

4. Fase kematian

Tahap kematian memiliki karakteristik yaitu menurunnya populasi bakteri yang disebabkan kematian. Tahap kematian ini terjadi karena habisnya nutrisi dan energi pada media perkembangan bakteri.

2.1.3. *Staphylococcus*

Bakteri *Staphylococcus* berisi bahan ekstraseluler dan polisakarida antigenik. Peptidoglikan bakteri *Staphylococcus* terdiri dari antigen yang berperan untuk mencegah adanya proses fagositosis yang dilakukan sel inang. Polisakarida dalam bakteri termasuk dalam kategori A yaitu yang membentuk dinding sel dan mampu larut dalam asam trikloroasetat. Peptidoglikan dapat dipecah dengan lisozim atau asam kuat. Dinding sel bakteri ini terdiri dari peptidoglikan dan asam teikoat yang dapat dimanfaatkan dalam penyatuan peptidoglikan dengan antigen. Bahan ekstraseluler seperti enzim dan toksin yang diproduksi bakteri serta kemampuan pembelahan ke dalam jaringan sel inang menyebabkan bakteri *Staphylococcus* dapat menyebabkan penyakit (Husna, 2018).

Bakteri dengan genus *Staphylococcus* memiliki berbagai jenis spesies yang berbeda-beda. Setiap spesies dari genus *Staphylococcus* dibedakan berdasarkan faktor virulensi yang berbeda serta plasmid yang mengkode protein dalam resistensi antibiotik. Faktor virulensi adalah hasil suatu mikroorganisme dalam membentuk regulasi gen yang

dapat digunakan bakteri dalam meningkatkan potensi patogen (menyebabkan penyakit) pada tubuh inang serta mempertahankan diri bakteri dari sel inang (Larasati et al., 2020). Bakteri *Staphylococcus* memiliki kemampuan dalam mempertahankan diri. Bentuk pertahanan diri seperti mencegah fagositosis oleh sel inang dengan permukaan sel bakteri membentuk mikrokapsul (simpai polisakarida).

2.1.4. *Staphylococcus aureus*



Gambar 2. Gambar Bakteri *Staphylococcus aureus*
(Sumber: Minto, 2019)

Bakteri *Staphylococcus aureus* ialah bakteri gram positif dengan sifat patogen yang menyebabkan infeksi. *Staphylococcus aureus* mengandung enzim koagulase yang dapat mendegradasi matriks ekstraseluler sehingga masuk dalam spesies bakteri paling invasif. Bakteri *Staphylococcus aureus* mengeluarkan hemosilin, toksin ekstraseluler, enzim serta komponen seluler lain dibandingkan jenis bakteri lainnya dalam jumlah banyak. Karakteristik dari bakteri yaitu memiliki ukuran 1µm yang tersusun secara tidak teratur, bakteri gram positif yang piogenik (infeksi peradangan lokal), nonmotil, bertahan hidup dengan berkelompok, dan tidak membentuk spora. Bakteri ini

bersifat destruktif lokal yang dapat membentuk infeksi lokal (piogenik) pada bagian tubuh makhluk hidup seperti kulit, tulang dan katup jantung (Husna, 2018). *Staphylococcus aureus* memiliki sifat anaerob fakultatif atau dapat bertahan hidup pada lingkungan yang krisis oksigen, katalase positif dan oksidase negatif (Dewi et al., 2015). Oleh karena itu, bakteri *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh dan berkembang biak dengan atau tidak adanya oksigen.

Dalam waktu 24 jam, kelompok bakteri ini dapat tumbuh hingga diameter 4 mm dalam suhu 6,5 - 46°C dan pH 4,2 – 9,3. Bakteri ini juga membentuk zat warna kuning keemasan (Putri, 2010). Zat warna terbentuk zat warna lipochrom yang ada ketika *Staphylococcus aureus* berada di suhu 37°C, namun pada suhu kamar (20-25°C) zat warna atau pigmen tersebut dapat terbentuk lebih baik dan waktu tumbuhnya 18-24 jam (Dewi et al., 2015). Zat berwarna kuning juga menjadi ciri khas bakteri *Staphylococcus aureus* karena pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* menghasilkan zat warna yang berbeda yaitu putih.

Staphylococcus aureus terdiri dari protein yang membantu sel bakteri menempel pada tubuh inang. Protein-protein ini, seperti fibronectin dan laminin, dapat membentuk matriks ekstraseluler pada permukaan sel inang epitel dan endotel (Husna, 2018). Beberapa bakteri *Staphylococcus aureus* mengandung mikrokapsul polisakarida yang bermanfaat dalam sel antifagositik dan memiliki ikatan protein fibrin

yang berperan dalam perlekatan jaringan tubuh inang dan sel bakteri pada darah. Husna (2018) mengatakan bahwa protein lain seperti MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) dimiliki oleh bakteri ini. Protein MSCRAMMs mengikat kolagen, fibrinogen, dan fibronektin dan melekat pada jaringan tubuh inang. *Staphylococcus aureus* menghasilkan enzim koagulase, yang mengkatalisis konversi fibrinogen menjadi fibrin. *Staphylococcus aureus* menghasilkan tujuh jenis enterotoksin, diantaranya tipe A, B, C, C1, C2, D, dan E (Dewi, 2013). Enterotoksin adalah racun yang berasal dari *Staphylococcus aureus* dengan rentang waktu inkubasi 1 sampai 8 jam (Prasetyo, 2015). *Staphylococcus aureus* memproduksi faktor virulensi yang menyebabkan penyakit. Faktor-faktor virulensi ini meliputi biofilm, protein pengikat fibronektin, faktor agregasi, hemosilin, Panton-Valentine Leukocidin (PVL), superantigen (SAg), dan protein A (Larasati et al., 2020).

Daya rusak bakteri *Staphylococcus aureus* bisa mengakibatkan infeksi dengan beberapa faktor sebagai berikut:

1. Protein yang ada dalam bakteri misalnya kolonisasi peningkatan adhesin dalam jaringan tubuh
2. Proses fagositosis dicegah oleh kedekatan komponen permukaan bakteri yang ada didalam kerangka kapsul dan protein A
3. Keberadaan protein invasi pada *Staphylococcus aureus* seperti leukocidin yang membuat perbedaan pada proses penyerangan

penyebaran bakteri di dalam jaringan tubuh inang dan menghambat terjadinya fagositosis

4. Protein yang terkandung dalam bakteri dapat menjadi racun dan merusak membran. Contoh protein tersebut antara lain *leukocidin*, *leukotoxin*, dan *hemolysin* (Dewi, 2013).
5. Zat-zat biokimia seperti katalase dan karotenoid berperan dalam memperluas pertahanan
6. Enzim koagulase yang dihasilkan oleh bakteri dapat mempengaruhi mekanisme kinerja immunoglobulin tertentu
7. Gen yang terkandung pada bakteri bersifat kebal atau resisten pada mikroba tertentu

Infeksi *Staphylococcus aureus* dapat terjadi dalam beberapa tahapan diantaranya:

1. Menempelnya sel bakteri pada protein sel inang

Proses di mana protein permukaan yang terkandung dalam sel bakteri membantu sel bakteri menempel pada sel inang kemudian enzim lipase hasil dari bakteri *Staphylococcus aureus* bertanggung jawab untuk pemecahan lemak pada permukaan kulit, yang terlibat dalam perkembangan abses kulit.

2. Invasi

Invasi dilakukan oleh sekelompok protein ekstraseluler seperti α toksin, β toksin, leukotoksin, koagulase, eksotoksin, stafilokinase

dan enzim lainnya. Protein ini merupakan hasil produksi dari bakteri *Staphylococcus aureus* (Husna, 2018).

3. Menentang sistem pertahanan pada sel inang.

2.1.5. Media Pemiakan Bakteri

Media kultur bakteri bermanfaat untuk tempat pertumbuhan mikroba, isolasi, perbanyakan, pengujian sifat fisiologis, dan perluasan banyaknya mikroba. Selama proses pertumbuhan, metode sterilkan dan aseptik harus diterapkan untuk mencegah kontaminasi media. Pertumbuhan dan perkembangan yang tepat dalam media membutuhkan persyaratan berikut: Media harus mengandung semua nutrisi yang diperlukan untuk perkembangan dan pertumbuhan mikroba; pH, tegangan permukaan, dan osmolalitas media harus memenuhi kebutuhan mikroba; media harus steril, artinya media yang dimaksud tidak ditumbuhi mikroba lain sebelum digunakan (Irianto, 2013).

Berikut ini beberapa contoh media yang sering digunakan dalam penelitian:

1. Medium *Nutrient Agar* (NA)

Medium *Nutrient Agar* (NA) dibuat sebagai tempat pertumbuhan mikroba dengan komposisi telah diketahui sehingga disebut dengan media khusus. Media NA terbuat dari komposisi agar yang telah padat dan oleh karena itu merupakan nutrisi padat untuk pertumbuhan bakteri. Peran agar tidak bertindak sebagai agen pengental yang memungkinkannya memadat pada suhu tertentu.

Media NA adalah media padat yang komposisinya adalah agar yang dipanaskan hingga suhu 95°C dan dilarutkan pada air (Irianto, 2013).

2. *Medium Brain Heart Infusion (BHI)*

Media *Brain Heart Infusion* (BHI) digunakan untuk isolasi dan budidaya berbagai jenis mikroorganisme. Media BHI ini dibutuhkan sebagai media cair dalam budidaya mikroorganisme, termasuk bakteri aerob dan anaerob, tetapi biasanya dikhususkan untuk budidaya bakteri anaerob. Awalnya, media BHI ini digunakan oleh Rosenow untuk menambahkan jaringan otak ke dalam kaldu dekstrosa. Formulasi ini ditemukan sebagai media yang efektif untuk menumbuhkan *Staphylococcus* (Irianto, 2013).

3. *Medium Mueller Hinton Agar (MHA)*

Medium Mueller Hinton Agar (MHA), digunakan dalam metode uji daya tahan anti mikroba dengan strategi difusi cakram *Kirby Baurer*. Media ini terdiri dari agar yang mengandung eksudat daging dan asam terhidrolisis yang berasal dari kasein. Agar ialah produk perantara padat yang terdiri dari pati atau zat bubuk yang bertindak sebagai perlindungan koloidal terhadap zat beracun yang diproduksi di dalam media kultur. Media MHA dapat digunakan sebelum kadaluarsa dan dengan suhu penyimpanan dibawah 25°C. Media yang sudah jadi disimpan pada suhu 2-8°C dan memiliki

masa simpan 1 minggu. Keringkan pada suhu 37°C selama 30 menit sebelum digunakan (Irianto, 2013).

2.1.6. Metode Kultur Bakteri

Kultur bakteri didasarkan pada prinsip mengisolasi bakteri dengan membiakkannya dalam dua cara diantaranya *in vivo* dan *in vitro*. Kultur bakteri *in vivo* melibatkan penumbuhan bakteri yang berasal dari tubuh pasien (organisme yang menginfeksi) dan kemudian *in vitro* dengan membawanya ke laboratorium untuk menumbuhkan bakteri dalam lingkungan yang tidak alami (buatan). Isolasi bakteri dengan cara mengumpulkan bakteri secara *in situ* atau di dalam suatu media dan membiakkannya di dalam media buatan dengan tujuan untuk mendapatkan biakan murni (Sabbathini et al., 2017). Metode untuk mengkultur bakteri antara lain metode cawan tuang, metode cawan gores serta metode cawan sebar.

Pada metode cawan tuang, bakteri tidak hanya disebarkan di permukaan medium agar, tetapi juga dibenamkan di dalam media agar, sehingga ada bakteri yang tumbuh di permukaan agar yang kaya maupun krisis O₂. Teknik cawan tuang mengharuskan agar yang belum padat atau dalam suhu >45°C dituangkan ke dalam cawan petri berisi suspensi bakteri, kemudian dihomogenisasi, dan dibiarkan memadat. Metode ini digunakan sebagai cara dalam mendapatkan kelompok alami dari mikroorganisme dan dilakukan dengan menggunakan beberapa langkah pengenceran yang bertingkat (Angelia, 2020).

Metode cawan gores dimaksudkan untuk isolasi mikroorganisme dari suatu campuran atau untuk meremajakan kultur dalam medium baru. Metode gores biasanya digunakan untuk isolasi koloni mikroba pada lempeng agar hingga mendapatkan koloni yang terpisah, dan biakan murni. Metode ini biasa disebut dengan metode *streak plate* dan dimaksudkan untuk menentukan jenis bakteri pada sampel yang diuji. Metode cawan gores diklasifikasikan menjadi beberapa jenis diantaranya metode gores kontinu, metode gores T, dan metode gores kuadran.

Metode cawan sebar adalah teknik isolasi mikroba di mana kultur mikroba dioleskan/diaplikasikan ke permukaan media agar yang telah dipadatkan. Metode cawan sebar dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada medium NA (*Nutrient Agar*). Ada dua pilihan dalam metode ini diantaranya *pour plate culture* dan *stock culture*. Perbedaan antara keduanya adalah campuran *plate culture* dituang saat medium masih cair, sedangkan *stock culture* dituang saat medium sudah memadat (Putriawati, 2018).

2.1.7. Uji Aktivitas Antibakteri

1. Metode Difusi

Prinsip kerja dari metode difusi adalah suatu zat dapat didistribusikan dalam bentuk agen antimikroba ke media padat yang mengandung bakteri uji yang telah diinokulasi (Nurhayati, 2020). Terdapat beberapa jenis metode difusi, antara lain cakram

(*disk*), parit (*ditch*), dan sumuran. Pada difusi ini digunakan kertas saring (*paper disc*) sebagai tempat untuk menampung atau menyerap zat antimikroba. Tujuan dari metode ini adalah untuk mengetahui ada atau tidaknya area terlarang berdasarkan area transparan yang terbentuk di sekitar kertas target. Kelebihan dari metode cakram adalah waktu pengujian yang relatif cepat (Nurhayati, 2020).

Metode difusi parit umumnya digunakan dengan media uji dalam bentuk krim atau salep. Caranya adalah dengan membuat alur sepanjang diameter media agar yang diinokulasi dengan bakteri, memasukkan zat uji ke dalam alur tersebut, menguji (menumbuhkan) pada suhu dan waktu tertentu, dan menentukan apakah terdapat area bakteri. Pada metode difusi sumuran, lubang dibuat pada media yang berisi bakteri yang telah diinokulasi. Zat antimikroba kemudian dimasukkan ke dalam lubang dan diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu untuk melihat apakah zona penghambatan terbentuk pada sekitar lubang dalam medium. Metode *hole punching* memiliki kelemahan yaitu adanya risiko pecahnya media agar yang dilubangi pada tempat pelubangan, sehingga menghambat penyerapan zat antimikroba dan mempengaruhi zona hambat yang terbentuk nantinya (Khusuma, 2019).

2. Metode Dilusi

Metode dilusi umumnya disebut sebagai pengenceran media. Mekanisme kerja dari metode dilusi adalah dengan menggunakan tabung reaksi yang berisi media cair yang diinokulasi dengan bakteri uji sebagai tempat uji, memberikan zat antimikroba dan mengamati perubahan kekeruhan pada tabung reaksi tersebut (Etikasari et al., 2017). Metode dilusi dibedakan menjadi pengenceran padat dan pengenceran cair (*broth dilution test*). Perbedaan antara pengenceran padat dan cair terletak pada media yang digunakan (Fitriani et al., 2019).

Metode dilusi agar cair dilaksanakan dengan menumbuhkan bakteri uji pada media cair encer berlapis yang mengandung zat antibakteri. Media yang terlihat transparan menampilkan angka KHM yang menunjukkan adanya resistensi antimikroba pada media uji. Larutan uji dengan konsentrasi terendah yang tampak transparan tanpa pertumbuhan bakteri uji disebut KHM. Larutan ini, yang disebut KHM, kemudian dikultur ulang dalam medium cair tanpa penambahan bakteri uji atau agen antimikroba dan diinkubasi selama 18 hingga 24 jam. Medium cair yang tetap jernih setelah diinkubasi disebut KBM (Pratiwi, 2017).

Uji dilusi padat mirip dengan metode dilusi cair, tetapi menggunakan medium padat. Keuntungan dari metode ini adalah

beberapa bakteri uji dapat diuji pada satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji (Etikasari et al., 2017).

2.2. Hipotesis Penelitian

1. Lama waktu fermentasi bahan organik pada *eco-enzyme* mempengaruhi daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus*.
2. Semakin lama waktu fermentasi bahan organik pada *eco-enzyme* semakin besar pula aktivitas daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus*.