

Optimasi aktivitas antibakteri metabolit sekunder dari bakteri endofit asal tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.)

Shabrina Qurrota A'yun, Ika Afifah Nugraheni*

Prodi Bioteknologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta

*Email: Ikaafifah@unisayogya.ac.id

Abstrak

Kasus resistensi antibiotik terhadap patogen terus meningkat dan menjadi ancaman serius. Pengembangan alternatif antibiotik baru merupakan strategi efektif untuk mengendalikan resistensi antibiotik. Bakteri endofit merupakan bakteri yang hidup pada jaringan tanaman tanpa menimbulkan gejala penyakit. Bakteri endofit mampu menghasilkan metabolit sekunder yang potensial sebagai antibakteri. Metabolit sekunder yang dihasilkan bakteri endofit dari tanaman ciplukan berpotensi sebagai antibakteri terhadap patogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan produksi senyawa metabolit sekunder dari bakteri endofit yang berpotensi sebagai antibakteri. Metode yang digunakan yaitu pengujian aktivitas antibakteri dari metabolit sekunder dengan difusi cakram (*Kirby Bauer*) untuk mendapatkan kondisi suhu, pH, dan waktu inkubasi yang optimal terhadap bakteri patogen *E. coli* dan *B. cereus*. Diameter zona hambat yang terbentuk terhadap bakteri patogen diamati, dilakukan perhitungan indeks zona hambat dan uji Anova, sehingga diperoleh kandidat antibakteri melalui biosintesis metabolit sekunder dari bakteri endofit dengan kondisi produksi yang optimal. Hasil penelitian menunjukkan metabolit sekunder dari bakteri endofit BA2(3) asal tanaman ciplukan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *E. coli* dan *B. cereus* dapat diproduksi secara optimal pada media pH 7, waktu inkubasi pertumbuhan selama 72 jam dan pada suhu 28 °C. Hasil penelitian aktivitas antibakteri ini diharapkan menjadi salah satu sumber pengembangan alternatif antibiotik baru untuk mengendalikan resistensi antibiotik pada berbagai bidang.

Kata Kunci: antibakteri; bakteri endofit; difusi cakram; metabolit sekunder; optimasi

1. Pendahuluan

Kasus resistensi antibiotik terhadap patogen terus meningkat dan menjadi ancaman serius. Resistensi terjadi saat patogen mengalami kekebalan dalam merespons antibiotik yang awalnya sensitif dalam pengobatan. Mekanisme resistensi baru muncul dan menyebar secara global, sehingga penyakit infeksi yang mudah menular semakin sulit diobati karena efektivitas antibiotik menurun (World Health Organization, 2020). Upaya sistematis perlu dilakukan untuk mengatasi kasus resistensi antibiotik di seluruh dunia. Indonesia menyusun *National Action Plan on AMR* berupa edukasi dan pengawasan yang masif kepada masyarakat (Kemenkes RI, 2017). Langkah tersebut mendorong perlunya penelitian dan pengembangan untuk mencari berbagai alternatif antibiotik.

Bakteri merupakan salah satu penyebab infeksi yang memicu resistensi antibiotik. Beberapa bakteri penyebab infeksi yaitu *Escherichia coli* (*E. coli*) dan *Bacillus cereus* (*B. cereus*). Infeksi *E. coli* dapat menyebabkan gejala gastrointestinal, seperti sakit perut, diare dan muntah, juga infeksi saluran kemih, sistem pernafasan dan penyakit lainnya (CDC, 2021). Bakteri *B. cereus* sering mencemari pada makanan cepat saji, dapat menyebabkan infeksi pada gastrointestinal, seperti sakit perut, mual, muntah juga infeksi pada mata dan saluran pernafasan (McDowell *et al.*, 2022). Gejala infeksi *E. coli* dan *B. cereus* dapat diatasi dengan pemberian antibiotik. Namun, saat ini patogen atau bakteri mampu mengembangkan mekanisme tubuh sehingga resisten terhadap antibiotik (CDC, 2022). Pemberian antibiotik yang tidak sesuai dengan aturan pemberian obat juga dapat memicu terjadinya resistensi patogen terhadap antibiotik tertentu (Satari, 2012).

Pengembangan alternatif antibiotik baru merupakan strategi yang efektif untuk mengendalikan kasus resistensi antibiotik (Frieri *et al.*, 2017). Hal ini mendorong perlunya penelitian dan pengembangan untuk mencari berbagai kandidat baru yang berpotensi sebagai antibiotik. Salah satu sumber potensi tersebut adalah senyawa aktif antibiotik seperti metabolit sekunder dari bahan alami.

Metabolit sekunder merupakan senyawa aktif yang dihasilkan oleh makhluk hidup, salah satunya dari bakteri endofit yang hidup dalam jaringan tumbuhan (Wulandari *et al.*, 2020). Metabolit sekunder dapat digunakan sebagai antibiotik, antikanker, antioksidan, antiinflamasi, immunosupresi dan antidiabetes (Desriani *et al.*, 2014). Senyawa metabolit sekunder memiliki struktur yang kompleks dan sulit disintesis, sehingga ketersediaannya jarang dijumpai di pasaran, dan memiliki nilai ekonomi

yang tinggi (Mariska, 2013). Tidak hanya pada bidang kesehatan, metabolit sekunder juga dibutuhkan pada bidang pertanian. Menurut Nabila (2021), metabolit sekunder dari mikroba endofit sangat berpotensi menjadi agen biokontrol pada penyakit yang menyerang tanaman. Pemanfaatan bakteri endofit dengan kemampuan antibakteri pada tanaman memiliki potensi perkembangan sebagai pupuk hayati (Nugraheni, 2022).

Tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) adalah salah satu tanaman yang sudah sejak lama dimanfaatkan sebagai pengobatan tradisional di Indonesia (Wulandari *et al.*, 2020). Ciplukan digunakan untuk mengobati malaria, hipertensi, diabetes, penurunan kolesterol, tuberkulosis, asma, kanker usus dan sebagainya (Sharma *et al.*, 2015). Ciplukan memiliki banyak senyawa bioaktif untuk fungsi pengobatan tersebut, dan diantaranya memiliki aktivitas antibiotik (Wulandari *et al.*, 2020). Namun, pemanfaatan antibiotik dari tanaman ciplukan belum banyak dilakukan.

Secara alami senyawa metabolit sekunder dihasilkan oleh bakteri dalam jumlah sedikit. Faktor pertumbuhan bakteri endofit perlu dioptimalkan agar produksi senyawa metabolit sekunder sebagai antibiotik maksimal (Wulandari *et al.*, 2020). Faktor yang mempengaruhi produksi metabolit sekunder diantaranya suhu, pH, waktu inkubasi, intensitas cahaya, oksigen dan optimasi media (Yani, 2016).

Beberapa isolat bakteri endofit dari tanaman ciplukan memiliki kemampuan membentuk zona hambat terhadap bakteri patogen *E. coli* dan *S. aureus*. Namun, diketahui dari penelitian sebelumnya indeks zona hambat berupa zona bening yang terbentuk masih rendah, sehingga diperlukan optimasi untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder dengan aktivitas antibakteri. Optimasi dilakukan terhadap kandidat bakteri endofit yang telah memberikan nilai zona hambat tertinggi pada tahap sebelumnya, salah satunya adalah isolat BA2(3) (Nugraheni, 2021). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimal untuk produksi metabolit sekunder dari bakteri endofit isolat BA2(3) asal tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen *E. coli* dan *B. cereus*.

2. Metode Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah tabung reaksi (Herma), gelas beker (Herma), cawan petri (Herma), gelas ukur 100 mL (Iwaki), erlenmeyer 250 mL (Herma), mikropipet, tip putih, tip kuning, PCR tube 1,5 ml, jarum ose, batang drigalsky, bunsen, kertas cakram diameter 6 mm, kertas label, timbangan analitik, pinset, kertas pH-meter, termometer, kuvet, spektrofotometer, sentrifuge, vortex, autoklaf, inkubator, dan jangka sorong.

Bahan-bahan yang digunakan adalah isolat bakteri endofit BA2(3) dari koleksi Laboratorium Biologi Molekuler Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta, isolat bakteri patogen *E. coli* dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pertanian Universitas Gadjah Mada, dan *B. cereus* dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta, media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), aquades steril, alkohol 70%, HCl 1M, NaOH 1M, dan NaCl 0,9%.

2.1. Fermentasi Bakteri Endofit Isolat BA2(3)

Penelitian ini diawali dengan tahap fermentasi bakteri. Isolat BA2(3) diinokulasikan sebanyak satu ose pada media NA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang sebagai awal persiapan proses fermentasi. Selanjutnya, isolat diambil sebanyak satu ose dan dipindahkan ke dalam 150 mL media NB untuk difermentasikan (Iqlima *et al.*, 2017). Fermentasi bakteri dimulai dari jam ke-0 hingga jam ke-120 pada suhu ruang. Selama fermentasi dilakukan sampling setiap 2 jam sekali. Hasil sampling yang didapatkan digunakan untuk pengukuran laju pertumbuhan bakteri.

2.2. Perhitungan Laju Pertumbuhan Bakteri Endofit Isolat BA2(3)

Laju pertumbuhan isolat BA2(3) dihitung dengan cara mengamati densitas pertumbuhan bakteri endofit dalam waktu tertentu menggunakan spektrofotometer. Proses pengamatan dimulai dari jam ke-0 hingga jam ke-120. Perhitungan laju pertumbuhan dilakukan menggunakan kultur fermentasi bakteri endofit pada 150 mL media NB. Kemudian dilakukan sampling setiap 2 jam sekali, dengan cara mengambil sebanyak 5 mL kultur bakteri BA2(3) ke dalam kuvet dan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm (Elita *et al.*, 2013).

2.3. Perhitungan Koloni Bakteri

2.3.1. Perhitungan Densitas Bakteri Patogen

Bakteri *E. coli* dan *B. cereus* ditumbuhkan dalam 10 mL media NB selama 24 jam pada suhu ruang. Kultur bakteri patogen dilarutkan pada 10 mL NaCl 0,9%. Tingkat kekeruhan suspensi dibandingkan secara visual dengan standar *McFarland* 0,5. Selanjutnya, suspensi diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm, dengan kisaran absorbansi 0,08 hingga 0,13 (10^8 cfu/ml) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009). Suspensi yang telah dibuat kemudian diambil 0,1 mL ke dalam tabung steril dan ditambahkan sebanyak 9,9 mL NaCl 0,9% sehingga diperoleh densitas bakteri uji setara 10^7 cfu/mL (Oonmetta-aree *et al.*, 2005). Untuk uji difusi cakram, suspensi bakteri uji densitas 10^7 cfu/mL tersebut diambil sebanyak 100 μ l, dituangkan di media NA pada cawan petri dan diratakan menggunakan batang drigalsky.

2.3.2. Perhitungan Total Plate Count Bakteri Endofit BA2(3)

Perhitungan *Total Plate Count* (TPC) dilakukan untuk mengetahui jumlah koloni bakteri endofit yang diujikan secara kuantitatif. Bakteri endofit BA2(3) ditumbuhkan pada 10 mL media NB selama 72 jam pada suhu ruang, kemudian diencerkan secara bertingkat dari 10^{-1} sampai 10^{-10} . Kultur bakteri BA2(3) diambil sebanyak 1 mL ke dalam 9 mL aquades pada tabung reaksi, dihomogenkan dengan vortex menjadi faktor pengenceran 10^{-1} . Dari faktor pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 mL ke dalam 9 mL aquades, dihomogenkan menjadi faktor pengenceran 10^{-2} . Cara tersebut diulangi sampai faktor pengenceran 10^{-10} . Selanjutnya masing-masing tingkat pengenceran ditumbuhkan pada media NA secara *spread plate*. Suspensi bakteri diambil dari tabung pengenceran sebanyak 0,1 mL dengan mikropipet ke dalam media NA, lalu diratakan menggunakan batang drigalsky. Setelah 24 jam, koloni yang tumbuh pada media NA dihitung (Arifan *et al.*, 2019).

2.4. Uji Aktivitas Antibakteri terhadap *E. coli* dan *B. cereus*

Pengujian aktivitas antibiotik dilakukan dengan metode difusi cakram (*Kirby Bauer*) dengan kertas cakram diameter 6 mm.

2.4.1. Variasi pH

Disiapkan media NB sebanyak 50 mL pada tiga erlenmeyer, kemudian masing-masing diberi label pH 6, 7 dan 8. pH awal media NB adalah netral (pH 7). Media NB pH 6 dibuat dengan menambahkan larutan HCl 1M sebanyak 5 tetes, yaitu sampai pH 6 pada kertas pH-meter. Media NB pH 8 dibuat dengan menambahkan larutan NaOH 1M sebanyak 5 tetes, yaitu sampai pH 8 pada kertas pH-meter.

Media NB dari berbagai variasi pH sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam tabung yang sudah diberi nama pH 6, 7 dan 8. Bakteri endofit diambil dari biakan media NA dan dikultur ke dalam masing-masing tabung media NB. Selanjutnya, kultur bakteri diinkubasi selama 72 jam pada suhu ruang. Kultur bakteri siap digunakan untuk tahap berikutnya (Iqlima *et al.*, 2017).

2.4.2. Variasi suhu

Media NB sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam masing-masing tabung yang sudah diberi nama 28, 31, 34 dan 37 °C. Bakteri endofit diambil dari biakan media NA dan dikultur ke dalam tabung media NB. Selanjutnya, kultur bakteri diinkubasi pada inkubator yang sudah diatur pada suhu sesuai variasi perlakuan selama 72 jam. Selanjutnya, kultur bakteri siap digunakan untuk tahap berikutnya (Iqlima *et al.*, 2017).

2.4.3. Variasi waktu inkubasi

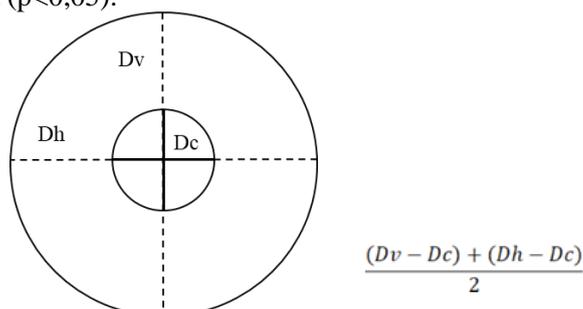
Media NB sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam masing-masing tabung yang sudah diberi nama 48, 60, 72, dan 84 jam. Bakteri endofit diambil dari biakan media NA dan dikultur ke dalam tabung media NB. Selanjutnya, kultur bakteri diinkubasi sesuai dengan variasi perlakuan yaitu 48, 60, 72, dan 84 jam pada suhu ruang. Kultur bakteri siap digunakan untuk pengujian tahap berikutnya (Iqlima *et al.*, 2017).

Semua suspensi bakteri endofit yang telah ditumbuhkan pada variasi pH, suhu dan waktu inkubasi kemudian dipindahkan ke dalam tube sebanyak 1,5 mL dan disentrifugasi (Aslam *et al.*, 2011) dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Hasil sentrifugasi diperoleh dua lapisan pada

tube, yaitu lapisan supernatan dan biomassa. Sebanyak 50 µl supernatan bakteri ditambahkan pada kertas cakram 6 mm dan diletakkan pada cawan petri yang telah dituangkan 100 µl bakteri patogen. Setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu ruang, zona penghambatan yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong (Iqlima *et al.*, 2017). Kontrol positif menggunakan kloramfenikol 60 µg/mL (Iqlima *et al.*, 2017), kontrol negatif menggunakan media NB. Kontrol positif dan negatif dibandingkan dengan hasil optimasi tertinggi pada setiap parameter.

2.5. Pengolahan dan Analisis Data

Aktivitas antibakteri berupa zona hambat atau zona bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram. Zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dari tepi kertas cakram ke zona hambat terluar (Pelczar & Chan 1988). Diameter zona hambat yang terbentuk dihitung menggunakan rumus Perhitungan Diameter Zona Hambat (Winastri *et al.*, 2020). Selanjutnya data akan dianalisis menggunakan uji Anova untuk mengetahui pengaruh signifikan terhadap perbedaan kemampuan daya hambat ($p < 0,05$).



Diameter Zona Hambat =

Keterangan:

Dv: Diameter vertical

Dh: Diameter horizontal

Dc: Diameter cakram (Winastri *et al.*, 2020).

3. Hasil dan Pembahasan

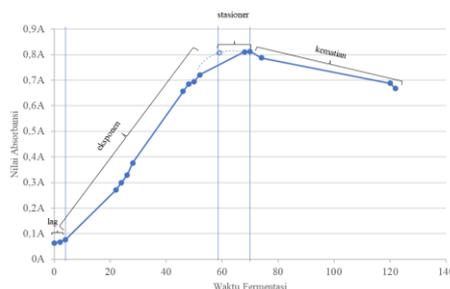
3.1. Fermentasi Bakteri Endofit Isolat BA2(3)

Isolat BA2(3) merupakan isolat bakteri endofit yang diperoleh dari batang tanaman ciplukan hasil proses isolasi sebelumnya. Batang tanaman ciplukan yang digunakan diambil di Kalurahan Margoluwih, Kapanewon Seyegan, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. Isolat BA2(3) merupakan bakteri endofit Gram positif, dengan bentuk koloni bulat berwarna oranye kekuningan, tidak mengkilap dan memiliki flagel (Wibowo, 2020). Bakteri BA2(3) bersifat aerob obligat sehingga membutuhkan oksigen untuk tumbuh optimal. Aerasi perlu dilakukan untuk memberi pasokan oksigen pada kultur bakteri. Aerasi dilakukan dengan menggojog kultur bakteri BA2(3) setiap 2 jam secara berkala.

Berdasarkan karakteristik morfologi dan fisiologi, isolat BA2(3) diduga termasuk dalam genus *Azomonas* sp. (Wibowo, 2020). Genus *Azomonas* sp. merupakan bakteri yang memiliki senyawa aktif sehingga mampu berasosiasi dan menstimulasi pertumbuhan tanaman. Berdasarkan Bashir (2022) *Azomonas* sp. yang diisolasi dari famili Amaranthaceae dapat menghambat pertumbuhan beberapa bakteri patogen. Selain itu, *Azomonas* sp. mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman dengan produksi fitohormon, dan sebagai bakteri pelarut fosfor sehingga fosfor lebih mudah larut dan diserap tanaman (Kartikawati *et al.*, 2017).

3.2. Perhitungan Laju Pertumbuhan Bakteri Endofit BA2(3)

Laju pertumbuhan ditentukan dengan membuat kurva pertumbuhan yang menghubungkan waktu inkubasi dengan absorbansi yang dihasilkan. Hasil perhitungan laju pertumbuhan tersaji dalam kurva dalam Gambar 1. Bakteri memiliki empat fase pertumbuhan yaitu fase lag, fase eksponen, fase stasioner, dan fase kematian.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan bakteri endofit BA2(3)

Fase lag bakteri BA2(3) terjadi pada jam ke-0 hingga jam ke-4. Fase lag merupakan fase adaptasi bakteri dengan lingkungan. Selama fase ini bakteri angka pertumbuhan bakteri sangat sedikit. Isolat BA2(3) yang digunakan dalam proses fermentasi diambil dari kultur BA2(3) pada media NA. Sehingga bakteri BA2(3) perlu beradaptasi pada media fermentasi yang baru. Hal ini sama dengan hasil penelitian Iqlima (2017), yang menunjukkan bakteri endofit B2D asal tanaman yakon (*Smallantus sonchifolius*) berada pada fase lag pada jam ke-0 sampai 4.

Fase eksponen bakteri BA2(3) terjadi pada jam ke-5 sampai 58. Fase eksponen adalah fase peningkatan jumlah sel bakteri secara intens. Jumlah sel hidup lebih banyak dari sel bakteri yang mati. Pada fase eksponen, bakteri sudah beradaptasi dengan lingkungan. Selain itu ketersediaan nutrisi media melimpah, sehingga pertumbuhan bakteri berlangsung sangat cepat dan optimal.

Bakteri BA2(3) memasuki fase stasioner pada jam ke-58 sampai 74. Grafik pertumbuhan bakteri dalam fase stasioner berlangsung linear. Selain itu, lingkungan sudah tidak optimal untuk pertumbuhan karena banyak zat sisa pertumbuhan dan ketersediaan nutrisi menipis. Sehingga bakteri mulai memproduksi metabolit sekunder untuk bertahan hidup. Berdasarkan Iqlima (2017), pada fase stasioner metabolit sekunder banyak diproduksi bakteri sebagai cara untuk bertahan hidup. Bakteri BA2(3) berada di fase kematian pada jam ke-74 dan terus menurun hingga akhir pengamatan di jam ke-122. Fase kematian ditandai dengan penurunan jumlah koloni bakteri.

Perhitungan laju pertumbuhan bakteri endofit BA2(3) dilakukan untuk mengetahui grafik laju pertumbuhan BA2(3) sehingga dapat diketahui masa fase stasioner saat metabolit sekunder mulai diproduksi. Pertumbuhan bakteri BA2(3) yang diduga termasuk dalam genus *Azomonas* tidak jauh berbeda dengan hasil yang dilakukan oleh Latt *et al.* (2018). Hasil Latt *et al.* (2018) menunjukkan bakteri *Azomonas agilis* mengalami fase lag pada jam ke-0 sampai 24, setelah itu terjadi fase eksponen dari jam ke-24 sampai 48. Fase stasioner mulai terjadi dari jam ke-48 sampai 72, setelah itu bakteri mengalami penurunan pertumbuhan dari jam ke-72 sampai 144.

Pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh berbagai faktor. Faktor pertumbuhan bakteri berupa suhu, pH, kadar oksigen, ketersediaan nutrisi, kadar air dan karakteristik bakteri. Selain itu, jenis fermentasi secara tertutup (batch) atau terbuka (continue) juga mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Menurut Pontawee *et al.* (2020), fermentasi secara tertutup akan mempercepat fase pertumbuhan bakteri, sedangkan fermentasi terbuka menyebabkan fase eksponen terjadi secara berkelanjutan.

3.3. Perhitungan Koloni Bakteri

Perhitungan densitas pada bakteri BA2(3) dan bakteri patogen uji dilakukan untuk mengetahui kepadatan densitas bakteri. Perhitungan dilakukan menggunakan *Total Plate Count* (TPC) untuk bakteri BA2(3), dan standar Mc Farland secara visual untuk bakteri patogen uji. Perhitungan bakteri BA2(3) dan patogen juga dilakukan menggunakan spektrofotometri untuk perhitungan secara kuantitatif. Hasil perhitungan densitas bakteri BA2(3) dan bakteri patogen tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Kepadatan Bakteri Endofit dan Patogen

Jenis Bakteri	Absorbansi (A)	Standar Mc Farland	Kepadatan (CFU/mL)
BA2(3)	0,086		16×10^8
<i>E. coli</i>	0,105	0,5	1×10^8
<i>B. cereus</i>	0,086		1×10^8

Perhitungan TPC dilakukan untuk menentukan jumlah koloni bakteri endofit BA2(3) secara kuantitatif. Perhitungan koloni menurut ISO (*International Standardization Organization*) sebanyak 10-300 koloni per cawan (ISO, 2007). Berdasarkan rumus hitung FDA (Food and Drug Administration), pada pengenceran 10⁻⁷ didapatkan kepadatan koloni sebanyak 16×10⁸ CFU/mL dengan nilai absorbansi 0,086A. Hasil pengukuran absorbansi suspensi bakteri diketahui pada standar Mc Farland 0,5, bakteri *E. coli* menunjukkan nilai absorbansi sebesar 0,105A. Nilai absorbansi bakteri *B. cereus* sebesar 0,086A. Hasil ini menunjukkan bahwa suspensi yang dibuat sudah sesuai dengan standar Mc Farland 0,5, dimana kisaran absorbansi standar Mc Farland 0,5 sebesar 0,08 hingga 0,13A, atau setara dengan 10⁸ CFU/mL (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009). Dapat diketahui, densitas bakteri endofit dan bakteri patogen untuk uji aktivitas antibakteri setara dengan kisaran 10⁸ CFU/ml.

Perhitungan standar Mc Farland digunakan untuk menggantikan jumlah bakteri individu dan memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan dalam prosedur uji antibakteri (Matuschek *et al.*, 2014). Standar Mc Farland 0,5 paling umum digunakan sebagai dasar pada uji hasil biakan bakteri dan uji kerentanan antibakteri (Balouiri *et al.*, 2016). Standar Mc Farland dapat digunakan sebagai standar dari kepadatan populasi 1×10¹ CFU/mL hingga kepadatan 1×10¹⁰ CFU/mL. Metode Mc Farland sangat sederhana dan ringkas, namun memiliki kekurangan warna larutan terkadang berbeda dengan warna bakteri yang ditumbuhkan pada media cair sehingga menimbulkan keraguan dan hasil yang tidak valid dalam menentukan kepadatan populasi (Seniati *et al.*, 2019). Sehingga perhitungan dengan spektrofotometri dilakukan sebagai transparansi hasil perhitungan dengan standar Mc Farland.

3.4. Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *E. coli* dan *B. cereus*

Pengujian optimasi aktivitas antibakteri metabolit sekunder BA2(3) dilakukan dengan metode difusi cakram (Kirby Bauer) terhadap bakteri patogen *E. coli* dan *B. cereus*. Perlakuan optimasi divariasikan pada kondisi lingkungan berdasarkan pH media, waktu inkubasi dan suhu. Pembahasan hasil pada setiap variasi sebagai berikut.

3.4.1. Variasi pH

Hasil pengujian aktivitas antibakteri metabolit sekunder bakteri endofit BA2(3) pada media dengan variasi pH menunjukkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *E. coli* dan *B. cereus*. Dari berbagai variasi pH, aktivitas antibakteri optimal pada pH tertentu. Luas diameter zona hambat yang dihasilkan tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Diameter zona hambat metabolit sekunder bakteri BA2(3) variasi pH terhadap *E. coli* dan *B. cereus*

Variasi pH	Rerata diameter zona hambat (mm) ± standar deviasi	
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>
6	6,2±3,9 ^{bc}	0±0 ^a
7	8,7±4,9 ^c	0±0 ^a
8	3,5±3,3 ^b	3,6±2,7 ^b
Kontrol +	20±0,5 ^c	18±0,5 ^c
Kontrol -	0±0 ^a	0±0 ^a

Hasil uji aktivitas antibakteri isolat BA2(3) lebih baik dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* pada pH 7 sebesar 8,7 mm. Zona tersebut mengalami penurunan pada pH 6 dan 8. Bakteri BA2(3) menghasilkan zona hambat terhadap *B. cereus* pada pH 8 sebesar 3,6 mm. Namun, bakteri BA2(3) tidak menghasilkan zona hambat terhadap *B. cereus* pada pH 6 dan 7.

Hasil uji aktivitas antibakteri isolat BA2(3) terhadap *E. coli* pada pH 6 dan 7 pada kategori sedang. Hasil uji pada pH 8 dapat menghambat *E. coli* dan *B. cereus* pada kategori lemah. Zona hambat tertinggi dihasilkan pada pH 7, tetapi kemampuan zona hambat berbeda nyata dengan kontrol positif.

Hasil uji Anova nilai Fhitung lebih kecil dari nilai Ftabel, menunjukkan aktivitas antibakteri bakteri BA2(3) terhadap *E. coli* dan *B. cereus* pada variasi pH masing-masing berbeda. Hasil uji DMRT menunjukkan variasi pH 7 tidak berbeda nyata dengan pH 6 dan berbeda nyata dengan pH 8 terhadap *E. coli*. Variasi pH 8 berbeda nyata dengan pH 6 dan 7 terhadap *B. cereus*.

pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Enzim dibutuhkan bakteri untuk katalisis suatu reaksi yang berkaitan dengan pertumbuhan bakteri. Menurut Pelczar & Chan (2008), pH yang tidak sesuai menyebabkan tingginya konsentrasi ion H⁺ atau OH⁻ dalam substrat. Hal ini menyebabkan sisi aktif enzim berubah sehingga mengganggu permeabilitas membran dan transport aktif yang memicu lisis sel.

3.4.2. Variasi Waktu Inkubasi

Bakteri endofit BA2(3) optimal menghasilkan zona hambat terhadap *E. coli* dan *B. cereus* pada waktu inkubasi tertentu. Dalam uji ini, rentang waktu pengujian dipilih dari 48 sampai 84 jam. Hal ini didasari dari kurva pertumbuhan bakteri BA2(3). Rentang waktu ditentukan dari akhir fase eksponen dan fase stasioner. Luas diameter zona hambat yang dihasilkan tersaji pada Tabel 3.

Tabel 3. Diameter zona hambat metabolit sekunder bakteri BA2(3) variasi waktu inkubasi terhadap *E. coli* dan *B. cereus*.

Variasi waktu inkubasi	Rerata diameter zona hambat (mm) ± standar deviasi	
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>
48 jam	0±0 ^a	0±0 ^a
60 jam	0±0 ^a	0±0 ^a
72 jam	8,7±4,9 ^b	0±0 ^a
84 jam	8,0±3,5 ^b	0,39±0,6 ^b
Kontrol +	20±0,5 ^c	18±0,5 ^c
Kontrol -	0±0 ^a	0±0 ^a

Hasil pengujian aktivitas antibakteri isolat BA2(3) menghambat pertumbuhan *E. coli* pada waktu inkubasi 72 jam. Kemudian zona hambat menunjukkan penurunan di jam ke 84. Hasil pengujian aktivitas antibakteri pada *B. cereus* menghasilkan zona hambat di waktu inkubasi 84 jam. Hasil uji di waktu inkubasi 48 dan 60 jam tidak menghasilkan zona hambat terhadap *E. coli* dan *B. cereus*. Hal ini disebabkan bakteri BA2(3) masih berada di fase eksponen atau awal stasioner. Fase eksponen merupakan fase lonjakan pertumbuhan bakteri, didukung oleh nutrisi dan kondisi lingkungan yang baik. Menurut Iqlima *et al.* (2017), saat bakteri berada di lingkungan cukup nutrisi, bakteri belum membutuhkan metabolit sekunder. Oleh karena itu, bakteri endofit yang ditumbuhkan terlalu cepat tidak dapat memproduksi metabolit sekunder.

Variasi waktu inkubasi 72 jam dapat menghambat *E. coli* pada kategori sedang, dan tidak mampu menghambat *B. cereus*. Variasi waktu inkubasi 84 jam dapat menghambat *E. coli* pada kategori sedang, dan menghambat *B. cereus* pada kategori lemah. Zona hambat tertinggi dihasilkan pada waktu inkubasi 72 jam, tetapi kemampuan zona hambat berbeda nyata dengan kontrol positif.

Waktu inkubasi 72 jam merupakan waktu optimal produksi metabolit sekunder. Jam ke-72 merupakan akhir fase stasioner. Saat fase akhir stasioner banyak zat sisa pertumbuhan dan ketersediaan nutrisi menipis sehingga terjadi cekaman lingkungan. Cekaman lingkungan menginduksi enzim metabolit sekunder terakumulasi dan melepaskan gen penyintesis metabolit sekunder. Menurut Pratiwi (2008), bakteri melakukan sintesis metabolit sekunder untuk bertahan hidup pada lingkungan yang mencekam.

Hasil uji Anova menunjukkan aktivitas antibakteri bakteri BA2(3) terhadap *E. coli* dan *B. cereus* pada variasi waktu inkubasi masing-masing berbeda. Hasil uji DMRT menunjukkan variasi waktu inkubasi 72 jam setara dengan waktu inkubasi 84 jam dan berbeda nyata dengan waktu inkubasi 48 dan 60 jam terhadap *E. coli*. Variasi waktu inkubasi 84 jam berbeda nyata dengan waktu inkubasi 48 dan 60 jam terhadap *B. cereus*.

Waktu inkubasi bakteri yang optimal dapat mengoptimalkan produksi metabolit sekunder (Pelczar & Chan, 2008). Waktu yang dibutuhkan untuk mencapai fase pertumbuhan optimal bakteri endofit mempengaruhi produksi metabolit sekunder dan aktivitasnya. Bakteri mensintesis metabolit sekunder ketika nutrisi dalam media pertumbuhan habis pada akhir fase stasioner. Oleh karena itu, bakteri endofit yang ditumbuhkan terlalu cepat tidak dapat memproduksi metabolit sekunder secara optimal karena belum memasuki fase optimal untuk produksi metabolit sekunder (Pratiwi, 2008).

3.4.3. Variasi Suhu

Bakteri endofit BA2(3) menghasilkan zona hambat terhadap *E. coli* dan *B. cereus* optimal pada suhu tertentu. Luas diameter zona hambat yang dihasilkan tersaji pada Tabel 4.

Tabel 4. Diameter zona hambat metabolit sekunder bakteri BA2(3) variasi suhu inkubasi terhadap *E. coli* dan *B. cereus*.

Variasi suhu	Rerata diameter zona hambat (mm) ± standar deviasi	
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>
28 °C	8,7±4,9 ^c	0±0 ^a
31 °C	5,4±4,3 ^b	0±0 ^a
34 °C	6,9±2,8 ^{bc}	0±0 ^a
37 °C	0±0 ^a	0±0 ^a
Kontrol +	20±0,5 ^d	18±0,5 ^b
Kontrol -	0±0 ^a	0±0 ^a

Hasil uji aktivitas antibakteri isolat BA2(3) mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* pada suhu 28 °C. Zona tersebut mengalami penurunan pada suhu 31 dan 34 °C. Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* pada suhu 28, 31, dan 34 °C termasuk kategori sedang, tetapi tidak menghasilkan zona hambat pada 37 °C. Bakteri BA2(3) juga tidak menghasilkan zona hambat terhadap *B. cereus* pada semua variasi suhu. Zona hambat tertinggi dihasilkan pada suhu 28 °C terhadap *E. coli*, tetapi kemampuan zona hambat berbeda nyata dengan kontrol positif.

Hasil uji Anova menunjukkan aktivitas antibakteri bakteri BA2(3) terhadap *E. coli* dan *B. cereus* pada variasi suhu masing-masing berbeda (Lampiran 9 dan 10). Hasil uji DMRT menunjukkan variasi suhu 28 °C cukup setara dengan suhu 34 °C dan berbeda nyata dengan suhu 31 dan 37 °C terhadap *E. coli*. Variasi suhu 28, 31, 34 dan 37 °C tidak berbeda nyata terhadap *B. cereus*.

Suhu 28 °C merupakan kondisi optimal BA2(3) untuk memproduksi metabolit sekunder. Suhu optimal mempengaruhi pertumbuhan bakteri dan produksi metabolit sekunder. Menurut Knob & Carmona (2008), suhu berpengaruh terhadap kecepatan sintesis dan kerja enzim yang berkaitan dengan pertumbuhan bakteri. Menurut Respati (2017), suhu yang terlalu rendah akan mengurangi aktivitas enzim. Sedangkan suhu yang terlalu tinggi dapat mendenaturasi enzim dan memperbesar faktor stres sehingga pertumbuhan bakteri tidak optimal. Tidak jauh berbeda dengan genus *Azomonas* lainnya, berdasarkan penelitian Imtiyaz (2023) bakteri genus *Azomonas* yang diisolasi dari tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.) tumbuh dengan optimal pada suhu 27-37 °C.

Secara keseluruhan aktivitas antibakteri isolat BA2(3) lebih baik dalam menghambat pertumbuhan *E. coli*, dan kurang efektif terhadap bakteri *B. cereus*. Hal tersebut menunjukkan sensitivitas antibakteri BA2(3) lebih efektif menghambat bakteri Gram negatif. Kemampuan antibakteri BA2(3) diindikasikan efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen Gram negatif lainnya.

Perbedaan sifat morfologi dan fisiologi bakteri patogen juga mempengaruhi kemampuan antibakteri. *B. cereus* memiliki lapisan peptidoglikan tebal yang sulit ditembus dan dapat membentuk spora sebagai pertahanan pada lingkungan mencekam. Lingkungan pertumbuhan bakteri yang optimal juga mempengaruhi kemampuan bakteri dalam produksi metabolit sekunder. Menurut Iqlima *et al.* (2017), kondisi media pertumbuhan yang optimal berpengaruh pada kemampuan bakteri dalam sekresi metabolit sekunder.

Kloramfenikol sebagai kontrol positif digunakan untuk membandingkan potensi bakteri endofit dengan antibiotik yang telah teruji klinis. Kontrol positif menghasilkan zona hambat sangat kuat terhadap *E. coli* dan kuat terhadap *B. cereus*. Kloramfenikol merupakan antibiotik yang memiliki spektrum luas dalam menghambat bakteri Gram positif maupun Gram negatif. Berdasarkan Dian *et al.* (2015), kloramfenikol dapat menghentikan pertumbuhan bakteri dengan cara berikatan pada ribosom dan menghalangi aktivitas enzim peptidyltransferase, sehingga menghambat pembentukan ikatan peptida dan sintesis protein.

Kontrol negatif menggunakan media pertumbuhan NB. Berdasarkan hasil uji, kontrol negatif tidak dapat membentuk zona hambat pada *E. coli* maupun *B. cereus*. Hal ini menunjukkan bahwa zona hambat yang dihasilkan tidak dipengaruhi oleh zat pada media pertumbuhan, tetapi didapatkan dari metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibakteri dari bakteri BA2(3).

Produksi metabolit sekunder BA2(3) sebagai antibakteri optimal pada kondisi media dengan pH 7, waktu inkubasi selama 72 jam dan suhu 28 °C. Secara keseluruhan zona hambat tergolong sedang. Optimasi dilakukan berdasarkan hasil penelitian Setianah (2020), bakteri endofit BA2(3) yang diisolasi dari tanaman ciplukan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* tetapi belum optimal. Kedepannya, hasil penelitian optimasi ini diharapkan dapat digunakan sebagai pengetahuan dalam produksi dan pemanfaatan metabolit sekunder di berbagai bidang. Kemampuan antibakteri dari bakteri endofit dapat dikembangkan sebagai sumber alternatif antibiotik baru untuk mengendalikan resistensi antibiotik.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, disimpulkan bahwa metabolit sekunder dari bakteri endofit BA2(3) asal tanaman ciplukan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *E. coli* dapat diproduksi secara optimal pada pH media 7, waktu inkubasi pertumbuhan selama 72 jam dan pada suhu 28 °C. Hasil analisis menunjukkan setiap variasi perlakuan berpengaruh secara signifikan terhadap perbedaan kemampuan daya hambat ($F_{hitung} < 0,05$). Hasil penelitian aktivitas antibakteri ini diharapkan menjadi salah satu sumber pengembangan alternatif antibiotik baru untuk mengendalikan resistensi antibiotik pada berbagai bidang.

5. Ucapan terimakasih

Ucapan terimakasih kami haturkan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta atas dukungan dan pendanaan pada penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Arifan, F., Winarni, S., Wahyuningsih, W., Pudjihastuti, I., & Broto, R. W. (2019). Total plate count (tpc) analysis of processed ginger on tlogowungu village. Proceedings of the International Conference on Maritime and Archipelago (ICoMA 2018), 167; 377-379.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of pharmaceutical analysis, 6(2); 71-79.
- Cappuccino, J. G. & Sherman, N. (2014). Microbiology: a laboratory manual. US: Pearson.
- CDC. (2021). *E. coli* (*Escherichia coli*). Retrieved from US Department of Health & Human Services: <https://www.cdc.gov/ecoli/ecoli-symptoms.html>. Accessed on December 5, 2022.
- CDC. (2022). Antimicrobial resistance. Retrieved from Centers for Disease Control and Prevention: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>. Accessed on December 5, 2022.
- Clinical & Laboratory Standards Institute. (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standar-eighth edition M07-A8. US. National Committee for Clinical Laboratory Standards 29.
- Desriani, D., Safira, U. M., Bintang, M., Rivai, A & Lisdiyanti, P. (2014). Isolasi dan karakterisasi bakteri endofit dari tanaman binahong dan katepeng china. Jurnal Kesehatan Andalas, 3(2); 89-92.
- Elita, A., Saryono, S. & Christinr J. (2013). Penentuan waktu optimum produksi antimikroba dan uji fitokimia ekstrak kasar fermentasi bakteri endofit *Pseudomonas* sp. dari umbi tanaman dahlia. Journal Indonesia Chemistry Acta, 3(2); 56-62.
- Frieri, M., Kumar, K. & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. Journal of Infection and Public Health, 10(4); 369-378.
- Imron, M. F. & Purwanti, I. F. (2016). Uji kemampuan bakteri Azotobacter S8 dan bakteri Bacillus subtilis untuk menyisihkan trivalent chromium (Cr³⁺) pada limbah cair. Jurnal Teknik ITS, 5(1); 4-10.
- Iqlima, D., Puji, A. & Muhammad, A.W. (2017). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit B2D dari Batang Tanaman Yakon (*Smallanthus sonchifolius* (POEPP. & Endl.) H Rob.). JKK, 7(1); 36-42.
- ISO 7218. (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs, general requirements and guidance for microbiological examinations.
- Kartikawati, A.O., Trisilawati & Darwati, I. (2017). Pemanfaatan pupuk hayati (biofertilizer) pada tanaman rempah dan obat. Jurnal Perspektif, (16). 1, 33-43.

- Kemenkes RI. (2017). Peningkatan pelayanan kefarmasian dalam pengendalian resistensi antimikroba. Retrieved from Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kusumaningtyas, R.W., Noer, L & Putri, L. (2015). Potential of ciplukan (*Physalis angulata* L.) as source of functional ingredient. *Procedia Chemistry*, 1(4); 367-372.
- Kusumawati, D. E., Fachriyan, H. Pasaribu., dan Maria, B. (2014). aktivitas antibakteri isolat bakteri endofit dari tanaman miana (*Coleus scutellarioides* [L.] Benth.) terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. *Current Biochemistry*, 1 (1); 45-50.
- Latt, Z. K., Yu, S. S., Kyaw, E. P., Lynn, T. M., Nwe, M. T., Mon, W. W., & Aye, K. N. (2018). Using cellulolytic nitrogen fixing bacterium, *Azomonas agilis* for effective degradation of agricultural residues. *The Open Microbiology Journal*, 12; 154–162.
- Mahardika, W. A., Rukmia, M. G. I. & Pujiyanto, S. (2021). Isolation endophytic mould from ciplukan plant (*Physalis angulata* L.) and antibacterial potential against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *NICHE Journal of Tropical Biology*, 4(1); 33-39.
- Mariska, I. (2013). Metabolit sekunder: jalur pembentukan dan kegunaannya. Retrieved from Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Pertanian: <http://biogen.litbang.pertanian.go.id/metabolit-sekunder-jalur-pembentukan-dan-kegunaannya/>. Accessed on December 5, 2022.
- Matuschek, E., Brown, D. F. J., & Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), O255–O266
- McDowell, R. H., Sands, E. M & Friedman, H. (2022). *Bacillus cereus*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Nabila, T.T. Nugraheni, I. A., Widiyatmoko, R.S., Probowati, W. (2021). An in vitro study of the spore densities effect of *Trichoderma* spp. as biocontrol agent for fusarium wilt in cayenne pepper (*Capsicum* sp.). *International Journal of Health Science and Technology*, 3(1); 117-129.
- Nugraheni, I.A., Widyaningsih, N., Syarifah, S.M., Susila, W.A. (2022). Uji antagonis *Bacillus megaterium* terhadap *Fusarium oxysporum* dan pengaruhnya pada pertumbuhan tanaman cabai rawit. *Jurnal Biosense*, 5(1); 14-23.
- Nugraheni, I.A., Setianah, H & Wibowo, D. (2021). Aktivitas antibakteri dari bakteri endofit asal akar ciplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Biomedika*, 13(1); 48-55.
- Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P & Eumkeb, G. (2005). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT- Food sci technology*, (39); 1214-1220.
- Rodewald, M., Scherwinski, K., Fekete, A., Schmidt, S., Eberl, L., Schmid, J. C. S., Hartmann, A., Kopplin, P. S., Trognitz, B & Sessitsch, A. (2009). Interaction between potato and the endophyte *Burkholderia phytofirmans*. *Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs*; 63 – 66.
- Pratiwi, S.T. (2008). *Mikrobiologi farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Satari, M. H. (2012). Multidrug resistance (mdr) bakteri terhadap antibiotik. Bandung. Prosiding Temu Ilmiah; 1-7.
- Seniati, Marbiah, Irham, A. (2019). Pengukuran kepadatan bakteri *Vibrio harveyi* secara cepat dengan menggunakan spektrofotometer. *Agrokompleks*, 19(2); 12-19.
- Setianah, H., Nugraheni, I.A., Wibowo, D.S. (2021). aktivitas antibakteri isolat bakteri endofit asal daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Health of Studies*, 5(1); 50-61.
- Setianah, H. (2020). Isolasi bakteri endofit dari tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) berpotensi sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri patogen. Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi. Yogyakarta: Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta.
- Veselovsky, V. A., Dyachkova, M. S., Bespiatykh, D. A., Yunes, R. A., Shitikov, E. A., Polyayeva, P. S., Danilenko, V. N., Olekhovich, E. I., & Klimina, K. M. (2022). The gene expression profile differs in growth phases of the bifidobacterium longum culture. *Microorganisms* 10(8); 1683–1690.

- Wibowo, D. S. (2020). Eksplorasi bakteri endofit dari tanaman ciplukan (*Physalis angulate L.*): isolasi dan karakterisasi. Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi. Yogyakarta: Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta.
- World Health Organization. (2020). World Health Organization. Retrieved from Antibiotic resistance: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Accessed on December 5, 2022.
- Wulandari, R. H., Pujiyanto, S & Jannah, S. N. (2020). Pengaruh penambahan sumber karbon terhadap produksi antibakteri isolat endofit a1 tanaman ciplukan (*Physalis angulata L.*) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *NICHE Journal of Tropical Biology*, 3(2); 80-88.
- Yani, R. B. (2016). Pengaruh pH dan suhu terhadap produksi antibiotik dari isolat bakteri endofitik pada tumbuhan andalas. *Jurnal Silvikultur Tropika*, 12(1); 172-177.