

Isolasi Bakteri Endofit Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dan Uji Antibakteri Supernatan Crude Metabolit Sekunder Isolat Potensial terhadap *Staphylococcus aureus*

Maulida Aqlinia¹, Sri Pujiyanto² dan Wijanarka²

^{1,2)} Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro, Semarang
Email : maulidaqlinia114@gmail.com

Abstract

Nosocomial infections occur in patients under medical care and developed within 48-72 hours of admission to hospital, causing significant morbidity and mortality in patients. One of the microorganisms that often causes nosocomial infections is *Staphylococcus aureus*. Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) is a traditional Indonesian medicinal plant used for diarrhea medication and cleaning solutions due to infection. The purpose of this study was to determine the antibacterial activity of supernatant crude secondary metabolites from Bangle endophytic bacteria to inhibit the growth *S. aureus*. Isolation of endophytic bacteria on leaves, stems, rhizomes and roots to obtain pure isolates, potential antibacterial activity was selected so that potential isolates were obtained. The result of isolation obtained 16 isolates, there are 3 potential isolates with antibacterial activity against test bacteria with the codes Ri1, Ri4 and Ak1. Antibacterial activity of supernatant obtained an average inhibition zone diameter by Ri1, Ri4 and Ak1 respectively 6.98 mm, 8.12 mm and 9.25 mm. The results of statistical analysis showed the significance of the calculated F value < 0.05 F table so that the effect of antibacterial activity of supernatant was significantly different from one another. The antibacterial activity of Ak1 against *S. aureus* showed the best effect.

Keywords : *Antibacterial compounds, Bangle (Zingiber cassumunar Roxb.), Endophytic bacteria, Secondary metabolites*

Abstrak

Infeksi nosokomial adalah infeksi yang terjadi pada pasien selama menerima perawatan kesehatan dan berkembang dalam 48-72 jam setelah dirawat di RS, menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang signifikan pada pasien. Mikroorganisme yang sering menyebabkan infeksi nosokomial adalah *Staphylococcus aureus*. Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) merupakan salah satu tanaman obat tradisional Indonesia yang digunakan masyarakat untuk obat diare dan larutan pembersih karena infeksi. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari supernatan crude metabolit sekunder bakteri endofit Bangle dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Isolasi bakteri endofit dari bagian daun, batang, rimpang dan akar tanaman agar diperoleh isolat murni untuk diseleksi aktivitas antibakterinya dan didapatkan isolat potensial. Hasil isolasi diperoleh 16 isolat, 3 isolat diantaranya berpotensi memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji dengan kode isolat Ri1, Ri4 dan Ak1. Hasil uji antibakteri supernatan diperoleh rata-rata diameter zona hambat terhadap *S. aureus* oleh Ri1, Ri4 dan Ak1 berturut-turut sebesar 6,98 mm; 8,12 mm; dan 9,25 mm. Hasil analisis statistik menunjukkan signifikansi nilai F hitung $< F$ tabel 0,05 sehingga pengaruh aktivitas antibakteri supernatan isolat endofit potensial terhadap *S. aureus* berbeda secara signifikan satu dengan lainnya. Aktivitas antibakteri isolat Ak1 terhadap bakteri uji menunjukkan efek paling baik.

Kata Kunci : *Bakteri endofit, Bangle (Zingiber cassumunar Roxb.), Metabolit sekunder, Senyawa antibakteri*

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah dalam bidang kesehatan. Infeksi nosokomial atau yang sekarang disebut sebagai *Hospital Acquired Infection* (HAI) adalah infeksi yang didapat pasien selama menerima perawatan kesehatan. HAI adalah penyebab morbiditas dan mortalitas signifikan pada pasien yang menerima layanan kesehatan, dan baik secara langsung maupun tidak langsung menyebabkan kerugian karena menghabiskan keterbatasan sumber daya finansial yang seharusnya dialokasikan untuk pemberian layanan kesehatan (Nazir *et al.*, 2014). Penelitian WHO menunjukkan bahwa prevalensi HAIs paling banyak di Mediterania Timur dan Asia Tenggara yaitu sebesar 11,80% dan 10% sedangkan di Eropa dan Pasifik Barat masing-masing sebesar 7,70% dan 9% (Kurniawati *et al.*, 2015). Beberapa mikroorganisme yang sering berpotensi menyebabkan infeksi nosokomial diketahui paling banyak disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* termasuk MRSA dan VRSA, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinobacter baumannii*, anggota keluarga *Enterobacteriaceae* seperti *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* (Maazuddin *et al.*, 2014).

Insiden penyakit infeksi yang masih tinggi di Indonesia serta meningkatnya resistensi beberapa strain bakteri terhadap antibiotik maka perlu dilakukan penelitian untuk mencari senyawa antibakteri, salah satunya dengan meneliti tanaman obat tradisional yang telah lama dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia. Selain mudah didapat dan harganya relatif murah, pemanfaatannya juga memperlihatkan efek samping yang lebih kecil daripada penggunaan obat sintesis. Tanaman obat tradisional yang sering dimanfaatkan masyarakat untuk menangani beberapa penyakit salah satunya adalah tanaman Bangle.

Indonesia merupakan salah satu negara dengan kekayaan hayati terbesar di dunia yang memiliki lebih dari 30.000 spesies tanaman tingkat tinggi (Saxena *et al.*, 2011; Chavan *et al.*, 2013). Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) adalah salah satu spesies dari famili *Zingiberaceae* yang banyak digunakan sebagai obat tradisional di Indonesia. Tanaman ini mudah ditemukan dan dibudidayakan, sehingga merupakan obat tradisional yang cukup potensial untuk dieksplorasi manfaat yang terkandung di dalamnya. Hasil skrining fitokimia menunjukkan rimpang Bangle mengandung saponin, flavonoid, minyak atsiri, alkaloid, tanin, dan glikosida (Buldani *et al.*, 2017).

Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tumbuhan serta mampu membentuk suatu koloni dalam jaringan tumbuhan tanpa memberikan efek negatif pada inangnya (Kasi *et al.*,

2015). Bakteri endofit dapat diperoleh dengan cara diisolasi dari tanaman yang permukaannya telah disterilkan ataupun dapat diekstrak untuk memperoleh bakteri yang terdapat pada jaringan tanaman (Ryan *et al.*, 2008). Bakteri endofit mampu menghasilkan senyawa bioaktif bersifat antibakteri yang sama dengan tanaman inangnya, maka tidak perlu menebang tanaman aslinya untuk diambil sebagai simplisia, yang kemungkinan besar memerlukan puluhan tahun untuk dapat dipanen (Kusumawati *et al.*, 2014).

Pemilihan terhadap bakteri uji didasarkan pada penelitian sebelumnya yang membuktikan bahwa kapang endofit *Z. cassumunar* berhasil diisolasi oleh Pansanit dan Patcharee (2018), terdapat 1 isolat potensial dari total 44 kapang endofit yang diisolasi dari bagian daun *Z. cassumunar* yang diketahui spesies *Arthrinium* sp. MFLUCC16-1053, ekstrak etil asetat dari *Arthrinium* sp. MFLUCC16-1053 menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli* dengan MIC masing-masing adalah 31,25 dan 7,81 µg/mL.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengisolasi bakteri endofit dari tanaman Bangle dan menguji aktivitas antibakteri supernatan *crude* metabolit sekunder bakteri endofit Bangle terhadap *Staphylococcus aureus*. Metode pengujian aktivitas antibakteri pada penelitian ini menggunakan *Paper Disk Agar Diffusion Technique*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap yaitu preparasi dan pengambilan sampel, isolasi dan pemurnian bakteri endofit, karakterisasi, skrining aktivitas antibakteri isolat endofit, dan uji aktivitas antibakteri dari supernatan isolat endofit potensial, adapun metode yang dilakukan adalah sebagai berikut.

1. Sampel *Zingiber cassumunar* Roxb.

Sampel tanaman Bangle (*Z. cassumunar* Roxb.) dipanen langsung dari kebun di daerah Banyumanik Semarang. Pengambilan sampel dilakukan dengan membawa tanaman Bangle ke Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang.

2. Isolasi dan Pemurnian Bakteri Endofit

Sampel rimpang, akar, batang dan daun Bangle dalam keadaan segar dibersihkan dari kotoran yang menempel, dicuci dengan air mengalir dan dipotong menjadi beberapa bagian sepanjang 1-3 cm. Sampel disterilisasi permukaannya berturut-turut menggunakan alkohol 70% selama 1 menit, larutan NaClO 5,25% selama 3 menit, direndam dalam

alkohol 70% selama 30 detik kemudian dibilas tiga kali menggunakan *aquadest* steril. Sampel ditiriskan lalu sedikit ditumbuk dalam mortar steril dan diinokulasikan ke dalam medium NA yang telah ditambahkan nystatin 0,01% (b/v) pada cawan petri lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24-48 jam hingga terlihat pertumbuhan koloni. *Aquadest* dari bilasan terakhir digunakan sebagai kontrol yang dicawakan ke dalam media NA pada cawan petri yang berbeda. Koloni yang tumbuh di sekitar jaringan tanaman diamati kenampakan morfologi makroskopisnya seperti warna, bentuk, dan ukuran koloni. Isolat bakteri endofit disubkultur 4x hingga menjadi isolat murni lalu dijadikan stok kultur murni pada medium NA miring dalam tabung reaksi pada suhu 4°C.

3. Karakterisasi Isolat Bakteri Endofit

Karakterisasi morfologi bakteri endofit dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Karakterisasi morfologi makroskopis dilakukan dengan mengamati koloni bakteri yang tumbuh diatas permukaan media agar seperti bentuk, warna, margin, dan elevasi koloni. Karakterisasi morfologi mikroskopis dilakukan dengan serangkaian metode pewarnaan Gram sel bakteri lalu diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x.

4. Seleksi dan Skrining Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit

Isolat murni bakteri endofit dan bakteri uji disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 mL larutan NaCl steril 0,9% secara dari medium peremajaan yang telah berumur 24 jam. Kekeruhan yang diperoleh kemudian disetarakan dengan standar McFarland 0,5 yaitu setara dengan jumlah pertumbuhan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Uji daya hambat bakteri dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan *paper disk*. Sebanyak 20 μ L suspensi bakteri endofit diinokulasikan dengan cara diteteskan ke atas *paper disk* yang diletakkan di atas medium NA pada cawan petri yang telah disebar dengan suspensi bakteri uji. Diameter zona hambat yang muncul di sekitar cakram uji diukur menggunakan jangka sorong.

5. Uji Aktivitas Antibakteri Supernatan Isolat Endofit Potensial

Starter dibuat dengan menginokulasikan satu ose isolat murni bakteri endofit potensial dari media peremajaan yang telah berumur 24 jam secara aseptis ke dalam 2,5 ml media NB steril pada tabung reaksi lalu diinkubasi pada *shaker* inkubator dengan kecepatan 120 rpm suhu 37°C selama 24 jam.

Sebanyak 5% (v/v) starter diinokulasikan ke dalam erlenmeyer berisi 50 ml media NB steril

kemudian diinkubasi pada *shaker* inkubator dengan kecepatan 120 rpm suhu 37°C selama 54 jam, sampling dilakukan setiap 6 jam sekali pada jam ke-0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 dan 54 untuk dilakukan pengukuran pertumbuhannya dengan mengukur *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer ($\lambda = 600$ nm) (Elita *et al.*, 2013), yang digunakan sebagai acuan waktu pemanenan metabolit sekunder isolat bakteri endofit.

Supernatan dipanen dari hasil sentrifugasi bakteri endofit dalam media produksi pada *centrifuge* dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit dan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri.

Bakteri uji *S. aureus* disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 mL larutan NaCl steril 0,9% secara dari medium peremajaan yang telah berumur 24 jam. Kekeruhan yang diperoleh kemudian disetarakan dengan standar McFarland 0,5 yaitu setara dengan jumlah pertumbuhan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan *Paper Disk Agar Diffusion Technique*. Sebanyak 20 μ L supernatan diteteskan ke atas *paper disk* yang diletakkan di atas medium NA pada cawan petri yang telah disebar dengan suspensi bakteri uji. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali (triplo). Diameter zona hambat yang muncul di sekitar cakram uji diukur menggunakan jangka sorong.

6. Analisis Data

Metode penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan desain percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial. Sebanyak tiga isolat potensial yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji selanjutnya dilakukan uji antibakteri dari supernatannya terhadap *Staphylococcus aureus*. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Data kuantitatif berupa diameter zona hambat (zona bening) pada media agar, dianalisa secara statistik dengan tahapan tabulasi data, signifikansi antar kelompok perlakuan diuji dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) *Univariate* pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Isolasi dan Pemurnian Bakteri Endofit Bangle

Isolasi bakteri endofit merupakan langkah awal yang penting dilakukan agar didapatkan suatu biakan murni, sehingga dapat dikaji lebih lanjut potensinya. Hal penting untuk dapat mengisolasi bakteri endofit tanaman Bangle yaitu mikroba yang hadir di permukaan tanaman harus dihilangkan terlebih dahulu sehingga harus dimulai dengan serangkaian prosedur sterilisasi permukaan. Menurut Waheeda and Shyam (2017), parameter keberhasilan dalam sterilisasi permukaan yaitu tidak tumbuhnya mikroba apapun dalam cawan kontrol hasil bilasan *aquadest*

terakhir yang berarti bahwa bakteri yang tumbuh dalam cawan isolasi merupakan bakteri endofit yang berasal dari dalam jaringan tanaman dan bukan merupakan mikroba epifit kontaminan yang ada di permukaan sampel tanaman.

Hasil isolasi bakteri endofit dari bagian daun, batang, rimpang dan akar Bangle diperoleh koloni-koloni bakteri yang tumbuh pada medium NA setelah diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Berdasarkan hasil pemurnian, total seluruh isolat yang didapatkan sebanyak 16 isolat bakteri endofit. Sebanyak empat isolat berasal dari bagian daun dengan kode Da1, Da2, Da3, Da4; empat isolat dari bagian batang dengan kode Ba1, Ba2, Ba3, Ba4; empat isolat dari bagian rimpang dengan kode Ri1, Ri2, Ri3, Ri4; dan empat isolat dari akar dengan kode Ak1, Ak2, Ak3, Ak4 (lihat Tabel 1.).

Tabel 1. Hasil Pemurnian Isolat Bakteri Endofit Bangle

Asal Isolat	Jumlah Isolat	Kode Isolat
Daun	4	Da1, Da2, Da3, Da4
Batang	4	Ba1, Ba2, Ba3, Ba4
Rimpang	4	Ri1, Ri2, Ri3, Ri4
Akar	4	Ak1, Ak2, Ak3, Ak4

2. Karakterisasi Morfologi Bakteri Endofit

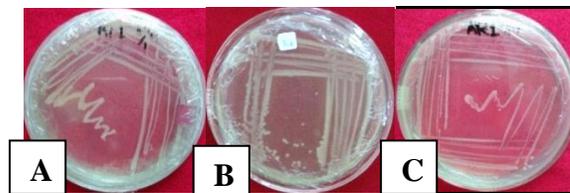
Hasil pemurnian isolat bakteri endofit tanaman Bangle yang telah diperoleh kemudian dilakukan karakterisasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis. Karakterisasi morfologi makroskopis terhadap koloni bakteri yang tumbuh di atas media agar bertujuan untuk mengamati koloni yang khas dari masing-masing isolat murni bakteri endofit yang membedakan antara satu isolat dengan isolat yang lain. Karakterisasi terhadap 16 koloni bakteri endofit Bangle berdasarkan hasil pengamatan terlihat berbeda-beda dan mempunyai kekhasan tersendiri. Karakterisasi morfologi mikroskopis terhadap sel bakteri endofit dilakukan dengan pewarnaan Gram yang bertujuan untuk mengelompokkan bakteri ke dalam dua kelompok besar berdasarkan struktur dinding sel dan permeabilitas membrannya yaitu Gram-positif dan Gram-negatif (Yunusa *et al.*, 2014).

Tabel 2. Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Endofit Bangle

Isolat	Morfologi Koloni			
	Bentuk	Warna	Margin	Elevasi
Da1	Circular	Putih susu	Serrate	Raise
Da2	Circular	Putih susu	Entire	Raise

Da3	Circular	Putih susu	Entire	Raise
Da4	Irregular	Putih susu	Serrate	Raise
Ba1	Circular	Putih kuning	Entire	Convex
Ba2	Irregular	Putih keruh	Lobate	Convex
Ba3	Irregular	Putih keruh	Lobate	Convex
Ba4	Irregular	Putih kuning	Serrate	Flat
Ri1	Irregular	Putih kuning	Lobate	Raise
Ri2	Irregular	Putih kuning	Lobate	Raise
Ri3	Circular	Putih kuning	Entire	Raise
Ri4	Circular	Putih kuning	Entire	Raise
Ak1	Irregular	Putih keruh	Serrate	Flat
Ak2	Irregular	Putih keruh	Lobate	Flat
Ak3	Irregular	Putih kuning	Lobate	Flat
Ak4	Irregular	Putih kuning	Lobate	Flat

Pada Tabel 2. menunjukkan karakteristik morfologi koloni bakteri endofit Bangle. Karakterisasi terhadap 16 isolat endofit berdasarkan hasil pengamatan terlihat berbeda-beda dan mempunyai kekhasan tersendiri Hasil pengamatan secara makroskopis bakteri endofit memiliki bentuk koloni bervariasi yaitu circular dan irregular. Bentuk tepian seperti serrate, lobate dan entire. Warna koloni yaitu putih susu, putih keruh dan putih kekuningan. Elevasi koloni meliputi raise, convex dan flat.



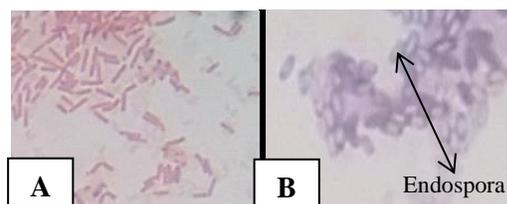
Gambar 1. Hasil pengamatan morfologi makroskopis koloni bakteri endofit potensial. (A. Isolat Ri1; B. Isolat Ri4; C. Isolat Ak1)

Tabel 3. Karakteristik Morfologi Sel Bakteri Endofit Bangle

Bagian Tanaman	Isolat	Morfologi Sel	
		Gram	Bentuk

Daun	Da1	Negatif	Basil Rods
	Da2	Negatif	Basil Rods
	Da3	Negatif	Basil Rods
	Da4	Negatif	Basil Rods
Batang	Ba1	Positif	Basil, Berendospora
	Ba2	Negatif	Basil
	Ba3	Positif	Basil, Berendospora
	Ba4	Positif	Basil, Berendospora
Rimpang	Ri1	Negatif	Basil Rods
	Ri2	Positif	Basil
	Ri3	Negatif	Basil Rods
	Ri4	Negatif	Basil Rods
Akar	Ak1	Positif	Basil
	Ak2	Positif	Basil, Berendospora
	Ak3	Negatif	Basil
	Ak4	Positif	Basil, Berendospora

Tabel 3. menunjukkan hasil karakterisasi morfologi sel bakteri endofit Bangle. Berdasarkan hasil pewarnaan Gram dan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x, rata-rata isolat bakteri endofit tanaman Bangle merupakan bakteri basil Gram-negatif namun beberapa isolat merupakan basil atau rods Gram-positif dan mempunyai endospora (lihat Gambar 2.).



Gambar 2. Hasil pengamatan morfologi mikroskopis sel bakteri endofit perbesaran 1000x (A. Basil Gram-negatif isolat Ak3; B. Basil Gram-positif berendospora isolat Ba3)

Pewarnaan Gram merupakan pewarnaan diferensial dengan menggunakan berbagai macam reagen warna. Pembuatan preparat apusan sel-sel bakteri terlebih dahulu difiksasi pada kaca preparat kemudian diwarnai dengan larutan kristal violet selama 1 menit lalu bilas dengan *aquadest* dan dikering-anginkan, kemudian diwarnai dengan larutan yodium 1 menit lalu bilas dengan *aquadest* dan dikering-anginkan, didekolorisasi selama 10 detik dengan etanol, diakhiri *counterstain* dengan safranin selama 1 menit. Menurut Hiremath dan Parashuram (2011), semua sel bakteri akan terwarnai kristal violet

dan yodium, tetapi hanya sel-sel Gram-negatif yang kehilangan warna ungu ketika dicuci dengan alkohol dan selanjutnya akan terwarnai oleh pewarna safranin sehingga sel-sel Gram-negatif akan berwarna merah, sel-sel Gram-positif akan tetap berwarna biru-ungu. Dinding sel Gram-positif memiliki lapisan peptidoglikan sangat tebal yang bertanggung jawab terhadap retensi pewarna kristal violet selama prosedur pewarnaan Gram. Sebaliknya, dinding sel Gram-negatif mengandung lapisan peptidoglikan tipis yang berdekatan dengan membran sitoplasma, hal tersebut menyebabkan dinding sel tidak mampu untuk mempertahankan pewarna kristal violet saat didekolorisasi dengan etanol selama pewarnaan Gram.

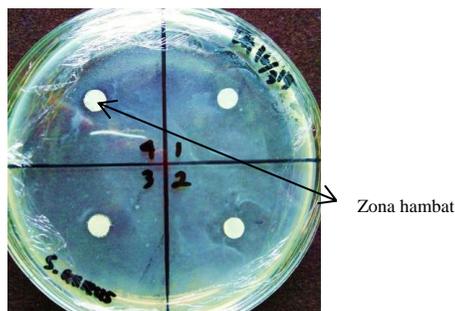
3. Seleksi dan Skrining Aktivitas Antibakteri Isolat Endofit

Skrining merupakan langkah awal dalam proses seleksi bakteri endofit tanaman Bangle yang memiliki potensi sebagai agen antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen penyebab infeksi seperti *Staphylococcus aureus*. Proses skrining dilakukan dengan uji antagonisme antara suspensi bakteri endofit terhadap bakteri patogen dalam 0,9% NaCl steril kepadatan standar McFarland 0,5 menggunakan *Paper Disk Agar Diffusion Technique*, bertujuan untuk mengetahui potensi bakteri endofit hasil isolasi yang mempunyai sifat antagonis terhadap *Staphylococcus aureus*. Hasil skrining akan diperoleh isolat potensial yang menghasilkan zona hambat di sekitar kertas cakram yang telah ditetesi suspensi bakteri endofit dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Tabel 4. Rata-rata Diameter Zona Hambat Skrining Aktivitas Antibakteri

NO	Kode Isolat	Diameter Zona Hambat (mm) <i>Staphylococcus aureus</i>
1.	Da1	6,00
2.	Da2	6,00
3.	Da3	6,20
4.	Da4	6,25
5.	Ba1	6,00
6.	Ba2	6,00
7.	Ba3	6,00
8.	Ba4	6,00
9.	Ri1	6,95
10.	Ri2	6,90
11.	Ri3	6,45
12.	Ri4	8,00
13.	Ak1	7,70
14.	Ak2	6,15
15.	Ak3	6,55
16.	Ak4	6,50

Skrining dilakukan sebanyak tiga kali (*triplo*) dan dilakukan perhitungan rata-rata diameter zona hambat dari ketiga proses skrining. Tabel 4. menunjukkan hasil rata-rata diameter zona hambat skrining aktivitas antibakteri isolat endofit Bangle. Isolat-isolat dengan sifat antagonis yang mampu menghambat bakteri patogen dijadikan dasar pemilihan isolat potensial yang memiliki daya kerja antibakteri berkekuatan sedang, diantaranya yaitu isolat Ri1 dan Ri4 yang diperoleh dari bagian rimpang, serta Ak1 yang diperoleh dari bagian akar dengan diameter zona hambat berturut-turut sebesar 6,95 dan 8,00 mm, serta 7,70 mm.



Gambar 3. Daya hambat isolat bakteri endofit terhadap *Staphylococcus aureus*

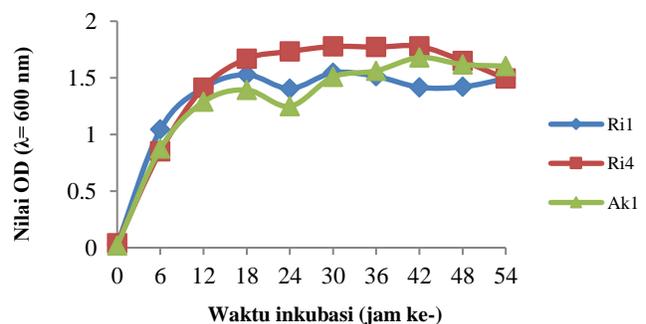
Hasil skrining menunjukkan bahwa isolat bakteri endofit tanaman Bangle memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* berdasarkan besar zona hambat termasuk ke dalam kategori sedang. Davis dan Stout (2009) membagi kekuatan daya antibakteri menjadi empat kategori, yaitu menghambat lemah (<5 mm), sedang (5-10 mm), kuat (10-20 mm), dan sangat kuat (>20 mm). Aktivitas penghambatan senyawa antibakteri terhadap patogen dipengaruhi oleh perbedaan ultrastruktur dan komposisi dinding sel antara bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Perbedaan-perbedaan dalam *envelope* sel tersebut memberikan sifat yang berbeda pada sel, khususnya respon terhadap tekanan eksternal termasuk panas, radiasi UV dan antibiotik (Mai-Prochnow *et al.*, 2016).

4. Aktivitas Antibakteri dari Supernatan Bakteri Endofit Potensial

Pengujian aktivitas antibakteri supernatan metabolit sekunder isolat bakteri endofit potensial tanaman Bangle dilakukan dengan *Paper Disk Agar Diffusion Technique*, bertujuan untuk mengetahui kekuatan aktivitas antibakteri atau daya hambat supernatan metabolit sekunder bakteri endofit potensial yang mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Besarnya aktivitas antibakteri ditentukan

dengan besarnya zona hambat atau zona bening yang terdapat disekitar *paper disk*.

Sebelum dilakukan proses produksi metabolit sekunder dalam media produksi cair, terlebih dahulu dilakukan pengukuran pertumbuhan isolat bakteri endofit potensial agar diketahui dinamika pertumbuhannya yang dapat dipahami dari kurva pertumbuhan. Kurva dibuat dengan cara mengukur tingkat pertumbuhan tiap selang waktu tertentu kemudian mengalurkan hasil pengukurannya dalam sebuah grafik yang menunjukkan hubungan antara biomassa sel pada suhu Y *versus* periode waktu pengukuran pada sumbu X. Menurut Rolfe *et al.* (2012), pertumbuhan bakteri pada umumnya ditandai dengan empat fase yang khas, yakni periode awal yang tampaknya tanpa pertumbuhan (fase lamban atau *lag phase*) diikuti oleh suatu periode pertumbuhan yang cepat (fase log), kemudian mendatar (fase statis atau *stationary phase*), dan akhirnya diikuti oleh suatu penurunan populasi sel-sel hidup (fase kematian atau penurunan).



Gambar 4. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Endofit Potensial

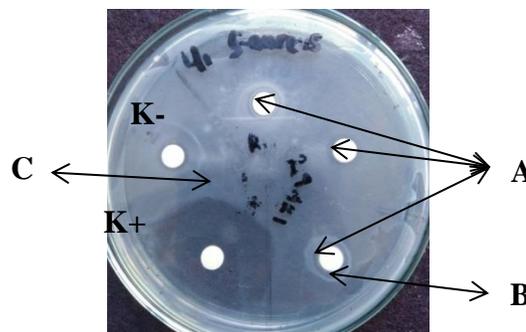
Fase stasioner akhir mendekati fase kematian awal isolat bakteri endofit pada kurva pertumbuhan digunakan sebagai acuan waktu pemanenan metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas antibakteri. Berdasarkan kurva pertumbuhan pada Gambar 4., fase logaritmik seluruh isolat potensial Ri1, Ri4 dan Ak1 dimulai pada jam ke-0 hingga jam ke-18 yang ditandai dengan munculnya nilai OD pada waktu inkubasi ke-0 hingga ke-18 jam dengan hasil pertumbuhan tertinggi isolat Ri1 terdapat pada waktu inkubasi ke-18 jam dengan nilai OD sebesar 1,527 lalu diikuti fase stasioner pada waktu inkubasi ke-24 hingga ke-36 jam, dilanjutkan fase kematian awal pada waktu inkubasi ke-42 jam. Fase stasioner akhir menjelang awal fase kematian pada isolat Ri1 terdapat pada waktu inkubasi ke-36 jam sedangkan isolat Ri4 dan Ak1 terdapat pada waktu inkubasi ke-42 jam.

Suharyono *et al.*, (2012) berpendapat bahwa metabolit sekunder merupakan suatu zat yang diproduksi oleh mikroorganisme setelah fase pertumbuhan aktif telah berhenti dan biasanya tidak esensial untuk pertumbuhan, meskipun begitu metabolit sekunder berfungsi sebagai nutrisi darurat untuk bertahan hidup. Metabolit sekunder tidak diproduksi pada saat pertumbuhan sel secara cepat (fase logaritmik) tetapi biasanya disintesis pada akhir siklus pertumbuhan sel, yaitu pada fase stasioner saat populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Keterbatasan zat gizi tersebut menyebabkan terakumulasinya inducer enzim metabolit sekunder dan terlepasnya gen-gen yang dapat memicu sintesis metabolit sekunder, biosintesisnya berkaitan dengan terjadinya induksi enzim yang berasal dari hasil metabolisme sel sendiri. Pertumbuhan antara bakteri satu dengan lainnya terjadi perbedaan disebabkan oleh kemampuan bakteri yang berbeda-beda dalam berkembang biak, tergantung pada medium pertumbuhan, pH, suhu, kemampuan membelah, kemampuan bertahan hidup, waktu inkubasi, kandungan enzim, kandungan metabolit sekunder dan nutrisi yang ada.

Tabel 5. Diameter zona hambat supernatan bakteri endofit potensial dan kontrol positif terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus*

Isolat Endofit Potensial	Diameter Zona Hambat (mm ± SD)
Ri1	6,98 ± ,098
Ri4	8,12 ± ,019
Ak1	9,25 ± ,058
Kontrol Positif	30,43 ± ,004

Hasil uji aktivitas antibakteri supernatan *crude* metabolit sekunder isolat potensial pada Tabel 5. menunjukkan bahwa isolat Ri1 menghambat bakteri uji dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 6,98 mm, isolat Ri4 sebesar 8,12 mm, dan isolate Ak1 sebesar 9,25 mm. Kekuatan daya antibakteri isolat potensial tersebut terhadap kedua bakteri uji berdasarkan besar zona hambat termasuk ke dalam kategori sedang. Davis dan Stout (2009) membagi kekuatan daya antibakteri menjadi empat kategori, yaitu menghambat lemah (<5 mm), sedang (5-10 mm), kuat (10-20 mm), dan sangat kuat (>20 mm).



Gambar 5. Daya hambat supernatan *crude* metabolit sekunder isolat endofit potensial terhadap *S. aureus*. (A. kertas cakram isolat bakteri endofit; B. Zona hambat supernatan isolat endofit; C. Bakteri uji secara *spread plate*; K+. Kontrol positif; K-. Kontrol negatif)

Efek antibakteri supernatan isolat Ak1 belum dapat menyamai antibiotik kloramfenikol 30 µg/ml sebagai kontrol positif dengan rata-rata zona hambat sebesar 30,96 mm. Hal ini karena metabolit sekunder dari supernatan isolat bakteri endofit belum murni dan masih merupakan campuran berbagai senyawa yang mungkin terdapat pada media produksi. *Paper disk* berisi media produksi steril dalam penelitian ini digunakan sebagai kontrol negatif, dalam hal ini tidak menunjukkan adanya zona hambat di sekitarnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa zona hambat yang dihasilkan tidak dipengaruhi oleh zat-zat yang mungkin terkandung di dalam media produksi, melainkan murni berasal dari suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri dalam supernatan isolat potensial.

Pengaruh aktivitas antibakteri dari supernatan isolat potensial terhadap *S. aureus* yang ditunjukkan oleh zona hambat dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA*, dilanjutkan dengan analisis perbedaan pengaruh masing-masing supernatan isolat potensial satu dengan yang lainnya menggunakan uji *Duncan's Multiple Range Test (DMRT)*. Hasil uji *One Way ANOVA* terhadap diameter zona hambat supernatan *crude* metabolit sekunder dari isolat bakteri endofit potensial menunjukkan nilai signifikansi dari nilai F sebesar 0,000. Nilai F hitung tersebut lebih kecil dari nilai F tabel 0,05 yang berarti bahwa pengaruh aktivitas antibakteri supernatan *crude* metabolit sekunder dari isolat bakteri endofit potensial terhadap *S. aureus* berbeda secara signifikan satu dengan yang lainnya.

Selanjutnya, perbedaan pengaruh aktivitas antibakteri masing-masing supernatan isolat potensial berdasarkan hasil uji DMRT menunjukkan bahwa pengaruh aktivitas antibakteri yang dihasilkan supernatan dari isolat Ri1 tidak berbeda secara

signifikan dengan supernatan dari isolat Ri4, begitu pula pengaruh aktivitas antibakteri yang dihasilkan supernatan dari isolat Ri4 tidak berbeda secara signifikan dengan supernatan dari isolat Ak1, namun pengaruh aktivitas antibakteri yang dihasilkan supernatan dari isolat Ri1 berbeda secara signifikan dengan supernatan dari isolat Ak1. Hal ini berarti aktivitas antibakteri supernatan dari isolat Ri1 dan Ri4 terhadap *S. aureus* sama baiknya, begitu pula dengan aktivitas antibakteri supernatan dari isolat Ri4 dan Ak1. Namun berdasarkan uji DMRT, supernatan dari isolat Ak1 memiliki aktivitas antibakteri yang paling baik untuk menghambat pertumbuhan *S. aureus* terbukti dari nilai rata-ratanya paling tinggi dari isolat lain dalam subset alfa 0,05 yang berbeda. Hal ini dikarenakan masing-masing isolat bakteri endofit mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibakteri, dimana isolat Ak1 memiliki kemampuan paling baik.

Aktivitas penghambatan senyawa antibakteri terhadap patogen dipengaruhi oleh perbedaan ultrastruktur dan komposisi dinding sel antara bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Perbedaan-perbedaan dalam *envelope* sel tersebut memberikan sifat yang berbeda pada sel, khususnya respon terhadap tekanan eksternal termasuk panas, radiasi UV dan antibiotik (Mai-Prochnow *et al.*, 2016).

Apabila dibandingkan dengan Gram-negatif, *Staphylococcus aureus* merupakan golongan bakteri Gram-positif yang memiliki lapisan dinding sel lebih tebal, tersusun oleh peptidoglikan (PGN) yang terdiri dari unit bergantian disakarida N-asetil glukosamin - asam N-asetil muramat (NAM-NAG) terhubung secara silang oleh rantai samping pentapeptida sebanyak 40–80 lapisan, merupakan molekul multi-gigadalton yang menyumbang sekitar 90% dari berat kering Gram-positif dan hanya 10% pada bakteri Gram-negatif. Tebal PGN Gram-positif mencapai 20-80 nm dengan komposisi terbesar teikoat, asam teikuronat dengan atau tanpa *envelope* yang terdiri dari protein dan berbagai macam polisakarida. (Malanovic and Karl, 2016).

Apabila lapisan penyusun dinding sel menjadi target kerja suatu senyawa antibakteri dan menyebabkan kerusakan atau hilangnya lapisan tersebut maka kekakuan dinding sel hilang dan akan mengakibatkan kematian. Oleh karena itu, modifikasi struktur PGN dapat meningkatkan resistensi terhadap agen antimikroba dan terkait dengan peningkatan virulensi bakteri. Menurut Babii *et al.* (2018), dalam kasus bakteri Gram-positif, bahkan ketika membran rusak secara ireversibel, sel tidak cepat hancur karena lapisan peptidoglikan tebal yang bertanggung jawab menjaga arsitektur sel untuk waktu yang lebih lama. Oleh karena itu, struktur dinding sel tersebut

sangat berpengaruh terhadap mekanisme kerja senyawa antibakteri dalam supernatan *crude* metabolit sekunder isolat bakteri endofit potensial dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus*.

KESIMPULAN

Bakteri endofit berhasil diisolasi dari bagian daun, batang, rimpang dan akar tanaman Bangle dengan total 16 isolat. Hasil skrining diperoleh 3 isolat potensial yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji dengan kode isolat Ri1, Ri4 dan Ak1. Hasil uji antibakteri supernatan isolate endofit potensial memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *S. aureus*. Aktivitas antibakteri isolat Ak1 terhadap bakteri uji menunjukkan efek paling baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Babii C., Gabriela M., Lucian G.B., Anca-Narcisa N., Irina G., Cosmin T.M., Laura-Gabriela S., Lucian M.B., Marius S. 2018. A Novel Synthetic Flavonoid with Potent Antibacterial Properties: In Vitro Activity and Proposed mode of Action. *Journal PLoS ONE*. 13(4): e0194898.
- Buldani A., Retno Y., Pertiwi S. 2017. Uji Efektivitas Ekstrak Rimpang Bangle (*Zingiber Cassumunar* Roxb.) sebagai Antibakteri terhadap *Vibrio cholerae* dan *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro dengan Metode Difusi Cakram. *2nd Seminar Nasional IPTEK Terapan (SENIT)*. 2579-9045.
- Chavan, R.B. dan Gaikwad, D.K. 2013. Antibacterial Activity of Medicinally Important Two Species of *Allophylus*- *Allophylus cobbe* (L.) Raeusch. and *Allophylus serratus* (Roxb.) Kurz. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2(1): 1-7.
- Davis, W.W. & Stout, T.R. 2009. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 22(4): 666-670.
- Elita A., Saryono S., Christine J. 2013. Penentuan Waktu Optimum Produksi Antimikrob dan Uji Ftokimia Ekstrak Kasar Fermentasi Bakteri Endofit *Pseudomonas* sp. dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). *Journal of Indonesia Chemistry Acta*. 3(2): 56–62.
- Hiremath P.S., and Parashuram B.. 2011. Automated Gram-staining Characterisation of Bacterial Cells Using Colour and Cell Wall Properties. *International Journal of*

- Biomedical Engineering and Technology*. 7(3): 257–265.
- Kasi Y.A., Posangi J., Wowor M., Bara R. 2015. Uji Efek Antibakteri Jamur Endofit Daun Mangrove *Avicennia marina* terhadap Bakteri Uji *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. *Ejournal Biomedik Unsrat*. 3(1): 112-117.
- Kurniawati A.F., Satyabakti P., Arbianti N. 2015. Perbedaan Risiko *Multidrug Resistance Organism* (MDRO) Menurut Faktor Risiko dan Kepatuhan *Hand Hygiene*. *Jurnal Berkala Epidemiologi*. 3(3): 277–289.
- Kusumawati D.E., Fachriyan H.P., Maria B. 2014. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit dari Tanaman Miana (*Coleus scutellarioides* L. Benth.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Journal Current Biochemistry*. 1(1): 45-50.
- Maazuddin M., Arshad H.M., Misba A.B. Mirza, Azizullah G. 2014. Nosocomial Infection: An Overview. *International Research Journal of Pharmacy*. 5(1): 2230-8407.
- Mai-Prochnow A., Maryse C., Jungmi H. and Anthony B.M. 2016. Gram Positive and Gram Negative Bacteria Difer in Their Sensitivity to Cold Plasma. *Scientific Reports*. 6: 38610.
- Malanovic N. and Karl L. 2016. Gram-positive Bacterial Cell Envelopes: The Impact on The Activity of Antimicrobial Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1858: 936–946.
- Nazir A., and Kadri S.M. 2014. An Overview of Hospital Acquired Infections and the Role of the Microbiology Laboratory. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 2(1): 21-27.
- Patcharee P. and Acharavadee P. 2018. Antibacterial Secondary Metabolites from an Endophytic Fungus *Arthrinium* sp. MFLUCC16-1053 Isolated from *Zingiber cassumunar*. *Mycology*. 9(4): 264-272.
- Rolfe M.D., Rice C.J., Lucchini S., Pin C., Thompson A., Cameron A.D.S., Alston M., Stringer M.F., Betts R.P., Baranyi J., Peck M.W. 2012. Lag Phase is A Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology*. 194: 686-701.
- Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J., Dowling D.N. 2008. Minireview Bacterial Endophytes: Recent Development and Application. *FEMS Microbiology Letters*. 278: 1-9.
- Saxena, G. dan Kalra, S.S. 2011. Antimicrobial Activity Pattern of Certain Terpenoids. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2(1): 87-91.
- Suharyono, Samsul R., Fibra N., Muhamad K. 2012. Pertumbuhan *L.casei* pada Berbagai Lama Fermentasi Minuman Sinbiotik dari Ekstrak Cincau Hijau (*Premna oblongifolia* Merr.). *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. 5(2).
- Waheeda K. and Shyam K.V. 2017. Formulation of Novel Surface Sterilization Method and Culture Media for the Isolation of Endophytic Actinomycetes from Medicinal Plants and its Antibacterial Activity. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*. 8: 399.
- Yunusa T., Idris A.N., Yahaya U. 2014. Laboratory Perspective of Gram Staining and its Significance in Investigations of Infectious Diseases. *African Journal of Medicine*. 1(4): 168-74.