

**Potensi Antibakteri Isolat Bakteri Endofit dari Tanaman Purwoceng
(*Pimpinella pruatjan* Molk.) Terhadap *Klebsiella pneumoniae*
dan *Salmonella typhi***

***Antibacterial Potential of Endophytic Bacteria Isolates from Purwoceng Plants
(Pimpinella Pruatjan Molk.) Against Klebsiella pneumoniae
and Salmonella typhi***

Wildiani Wilson*¹, Dewi Yuniliani²

¹Program Studi D-III Analis Kesehatan ²Program Studi D-IV Analis Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Semarang,
Jl. Kedung Mundu Raya No.18, Kedungmundu, Kec. Tembalang, Kota Semarang, Jawa Tengah
*Corresponding Author: wildianiwilson@unimus.ac.id

Received: February 28, 2019; Revise: April 15, 2019; Accepted: May 3, 2019

DOI : <https://doi.org/10.31001/biomedika.v12i1.426>

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui isolat bakteri endofit purwoceng sebagai antibakteri. Pengujian antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran. Isolat bakteri endofit potensial terlebih dahulu diinokulasi ke dalam media fermentasi cair selama 52 jam dan selanjutnya dilakukan proses ekstraksi menggunakan pelarut n-Heksan. Ekstrak kasar ini digunakan untuk pengujian antibakteri terhadap *K. pneumoniae* dan *S. typhi*. Aktivitas antibakteri isolat bakteri endofit menggunakan media MHA (*Mueller Hinton Agar*) dengan ketebalan 6 mm dan ukuran diameter sumuran 5 mm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri endofit tanaman purwoceng tidak dapat menghambat pertumbuhan *K. pneumoniae* dan *S. typhi*.

Kata kunci: antibakteri; bakteri endofit; purwoceng

ABSTRACT

This study aims to determine the isolates of purwoceng endophytic bacteria as antibacterial. Antibacterial testing was carried out using the well diffusion method. Potential endophytic bacterial isolates were first inoculated into liquid fermentation media for 52 hours and then extracted using n-hexane solvent. This crude extract is used for antibacterial testing against K. pneumoniae and S. typhi. The antibacterial activity of endophytic bacteria isolates using MHA (Mueller Hinton Agar) media with a thickness of 6 mm and a well diameter of 5 mm. The results showed that the isolates of purwoceng endophytic bacteria could not inhibit the growth of K. pneumoniae and S. typhi.

Keywords: antibacterial; endophytic bacteria; purwoceng



PENDAHULUAN

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molck.) merupakan tanaman endemik Indonesia yang telah diketahui berkhasiat obat yaitu sebagai aprodisiak (Nasihun, 2009), diuretik dan tonik (Roostika dkk., 2007). Khasiat obat dari tanaman tidak terlepas dari kandungan senyawa bioaktif yang dimilikinya seperti alkaloid, flavonoid, saponin (Karuppusamy, 2009), tanin (Utami dkk., 2008) dan yang lainnya. Melalui penelitian terdahulu, diketahui bahwa mikrobia dapat membantu proses metabolisme tanaman inang dan menghasilkan metabolit sekunder yang berpotensi (Tan & Zou, 2001). Mikrobia yang berada di dalam jaringan tanaman dikenal dengan mikrobia endofit. Mikrobia endofit yang umum ditemukan adalah jamur dan bakteri (Strobel & Daisy, 2003).

Kemampuan mikrobia endofit menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya, merupakan potensi yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikrobia endofit yang diisolasi dari tanaman tersebut. Senyawa bioaktif metabolit sekunder yang dihasilkan bakteri endofit dapat digunakan sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen (Ding dkk., 2011; Malfanova dkk., 2012). Wilson (2014) telah berhasil mengisolasi bakteri endofit dari akar tanaman purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molck.) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Kartikasari dan Putri (2016) juga dapat menunjukkan isolat bakteri endofit tanaman purwoceng menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *S. aureus*. Oleh karena itu, potensi antibakteri dari bakteri endofit Purwoceng (*Pimpinella*

pruatjan Molck.) dalam menghambat bakteri patogen penyebab infeksi manusia sangatlah besar sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut.

METODE PENELITIAN

1. Subkultur (peremajaan) Isolat Bakteri Endofit

Isolat bakteri endofit (GP11) yang telah diperoleh dari penelitian sebelumnya disubkultur. Kultur bakteri endofit diambil lalu disubkultur ke media TSB (*Tryptic Soy Broth*) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam. Kultur bakteri yang telah tumbuh diambil menggunakan ose dan dilakukan goresan kuadran. Setelah itu, diinkubasi selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diamati, jika koloni telah murni (tidak ada kontaminasi) maka isolat dilakukan pengecatan Gram dan diamati menggunakan mikroskop cahaya kemudian hasil pengamatan koloni dan pengecatan Gram dibandingkan dengan data penelitian sebelumnya. Selanjutnya, isolat digoreskan pada media TSA *slant* sebagai kultur murni.

2. Subkultur Bakteri Uji

Bakteri uji *K. pneumoniae* dan *S. typhi* disubkultur kembali dengan menginokulasikan pada media TSB lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Setelah inkubasi, sebanyak satu ose suspensi bakteri diambil dan diinokulasikan pada media MC dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Selain itu, isolat bakteri uji juga diinokulasikan pada media-media biokimia. Selanjutnya, bakteri dapat digunakan untuk pengujian antibakteri.

3. Fermentasi Metabolit Sekunder Isolat Bakteri Endofit (Elita *dkk.*, 2013)

Isolat bakteri endofit yang berumur 24 jam dari TSA miring, diambil 1 ose lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 30 ml media TSB dan diinkubasi selama 24 jam untuk digunakan sebagai starter inokulum. Selanjutnya starter inokulum diambil dan dilakukan pengenceran 10^{-1} dalam larutan ringer lalu kekeruhan dibandingkan dengan larutan standard McFarland 0.5. Starter inokulum kemudian diambil 10% v/v dan dimasukkan dalam 300 ml TSB steril lalu diinkubasi pada *shaker rotator* selama 52 jam dengan suhu ruang. Fermentasi bakteri endofit dipanen pada akhir fase stasioner. Hal ini berdasarkan pada Pelczar & Chan (1986), bahwa metabolit sekunder (antibiotik, vitamin, dan hormon) dihasilkan oleh mikroorganisme pada akhir fase stasioner pertumbuhannya.

4. Ekstraksi Metabolit Sekunder

Suspensi bakteri pada media fermentasi ditambahkan pelarut n-Heksan dengan perbandingan volume 1:1. Campuran larutan dikocok selama 10 menit dan didiamkan hingga terbentuk 3 lapisan. Lapisan pertama dan kedua yang terbentuk diambil dan lapisan bawah ditambahkan kembali dengan pelarut n-Heksan hingga tidak terbentuk tiga lapisan. Filtrat yang diperoleh selanjutnya diuapkan dengan waterbath pada suhu 55°C sampai pelarut menguap sempurna. Ekstrak kasar yang diperoleh digunakan untuk pengujian antibakteri.

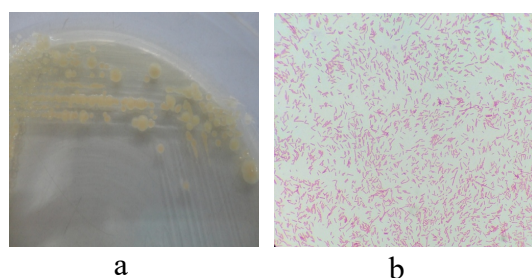
5. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Uji ini dilakukan dengan metode *agar well diffusion*. Biakan bakteri uji diambil sebanyak 1 ose lalu dimasukkan ke tabung

reaksi berisi 5 ml larutan ringer dan dihomogenkan. Kekeruhan dibandingkan dengan larutan standard McFarland 0.5. Sebanyak $100\mu\text{l}$ suspensi bakteri dimasukkan ke dalam media MHA dengan ketebalan 6 mm dan diratakan dengan *spreader glaas*. Setelah 30 menit proses inokulasi, sumuran agar dibuat dengan *cork borer* steril (diameter 5 mm). Setiap media dibuat tiga sumuran yang masing-masing diisi sebanyak $100\mu\text{l}$ ekstrak metabolit bakteri endofit, akuades steril (kontrol negatif) dan Amphotericin (kontrol positif). Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Pengamatan dilakukan setelah masa inkubasi yaitu dengan melihat dan mengukur zona bening yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat bakteri endofit GP11 berhasil disubkultur dan memiliki ciri-ciri koloni berwarna krem, tepian koloni bulat, elevasi cembung dan konsistensi smooth (Gambar 1a). Hasil pengecatan Gram isolat GP11 memiliki sifat Gram negatif, memiliki bentuk sel basil dan susunan soliter (Gambar 1b). Morfologi koloni dan sel yang diperoleh dari hasil peremajaan ini telah sesuai dengan ciri-ciri isolat GP11 berdasarkan penelitian Wilson (2014). Isolat GP11 selanjutnya diinokulasikan pada media fermentasi yaitu TSB dengan volume 300ml. Media fermentasi ini digunakan untuk memperoleh metabolit sekunder dari bakteri endofit. Media digojog selama tiga hari yang bertujuan untuk memberikan aerasi isolat GP11 sehingga kondisi ini membantu bakteri dalam menghasilkan metabolit sekunder.



Gambar 1. Morfologi koloni (a) dan morfologi sel (b) isolat bakteri endofit GP11 (Dokumentasi pribadi 2018).

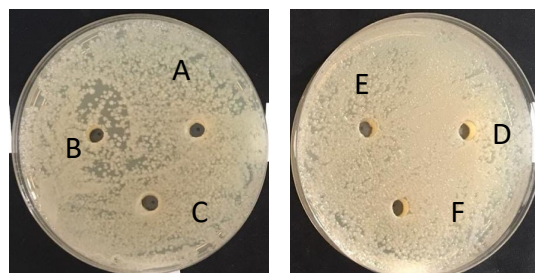
Pelarut n-heksan ditambahkan ke dalam media fermentasi kemudian dipisahkan menggunakan corong pisah. Lapisan bagian atas dikumpulkan dan dipisahkan menggunakan waterbath sampai terbentuk pasta (Gambar 2).



Gambar 2. Proses ekstraksi suspensi isolat GP11 dengan pelarut n-Heksan (a) dan ekstrak kasar isolat GP11 (b).

Ekstrak metabolit sekunder isolat GP11 yang diperoleh digunakan untuk pengujian antibakteri terhadap bakteri uji (patogen) dengan menggunakan difusi sumuran. Aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat disekitar sumuran yang telah diberi ekstrak metabolit sekunder

isolat GP11. Hasil pengujian antibakteri seperti Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Hasil daya hambat antibakteri ekstrak isolat GP11 terhadap *K.pneumoniae* dengan konsentrasi 50 mg/mL (A), 60 mg/mL (B), 70 mg/mL (C), 80 mg/mL (D), 90 mg/mL (E) dan 100mg/mL (F).

Berdasarkan Gambar 3 dan 4 diperoleh hasil bahwa ekstrak n-heksan isolat GP11 tidak dapat menghambat bakteri patogen *K. pneumoniae* dan *S. typhi* ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona jernih disekitar sumuran. Hal ini terjadi karena ekstrak dari isolat GP11 kemungkinan bukan senyawa yang bersifat antibakteri. Beberapa penelitian menunjukkan mikroba endofit menghasilkan zat antioksidan (Jayanti *et al.*, 2011), hormon IAA (Patel *et al.*, 2012), antitumor (Chen *et al.*, 2013) dan antifungal (Pereira de melo *et al.*, 2009). Selain itu, pelarut n-heksan dimungkinkan tidak melarutkan senyawa-senyawa fitokimia seperti alkaloid, flavonoid, saponin yang dimiliki oleh bakteri endofit. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Lertcanawanichakul *et al.* (2015) yang memperoleh hasil ekstrak fraksi n-heksan dari *Streptomyces lydicus* A2 tidak menghambat beberapa bakteri patogen ditandai dengan zona hambat yang terbentuk yaitu 0 mm.

KESIMPULAN

Isolat bakteri endofit belum potensial sebagai antibakteri untuk *K. pneumoniae* dan *S. typhi*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia yang telah memberikan dana hibah Penelitian Dosen pemula (PDP) tahun anggaran 2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Ding, R., Xue-Chang, W., Chao-Dong, Q, Yi Teng, Ou Li, Zha-Jun, Z., and Yu-Hua, Z. 2011. Isolation and Identification of Lipopeptide Antibiotics from *Paenibacillus elgii* B69 with Inhibitory Activity Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. The Journal of Microbiology. 49(6) : 942-949.
- Elita, A., Saryono, S., Christine, J. 2013. Penentuan Waktu Optimum Produksi Antimikroba dan Uji Fitokimia Ekstrak Kasar Fermentasi Bakteri Endofit *Pseudomonas sp.* Dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). J.Ind.Che.Acta Vol.3 (2) : 56.
- Jayanthi, G., Kamalraj, S., Karthikeyan, K. & Muthumary, J. 2011. Antimicrobial and antioxidant activity of the endophytic fungus *Phomopsis sp.* GJJM07 isolated from Mesua ferrea. *Int J. Curr. Sci.* 1: 85-90.
- Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of medicinal Plant Research.* 3(13): 1222-1239.
- Lertcanawanichakul, M., Pondet, K., Kwantep, J. 2015. In vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of Bioactive Compounds (Secondary Metabolites) Extracts from *Streptomyces lydicus* A2. *J App Pharm Sci.* 2015; 5 (02): 017-021.
- Malfanova, N., B. Lugtenberg and G. Berg. 2013. Bacterial Endophytes: Who and where, and what are they doing there?. To be published as a chapter in the book "Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere", Wiley-Blackwell. P: 15-37.
- Nasihun, F. 2009. Pengaruh pemberian ekstrak Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molck.) terhadap peningkatan indikator vitalitas pria. Studi eksperimental pada tikus jantan *Sparague dawley*. *Sains medika.* 1(1): 53-62.
- Patel, H.A., Patel, R.K., Khristi, S.M., Parikh, K, & Rajendran, G. 2012. Isolation and characterization of bacterial endophytes from *Lycopersicon esculentum* plant and their plant growth promoting characteristics. *Nepal Journal of Biotechnology.* 2(1): 37-52.
- Pelczar, M.J., Chan. E.C.S, and Pelczar, M.F. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, (diterjemahkan). Penerbit Universitas Indonesia: Jakarta.
- Pereira, P., Ibanez, F., Rosenblueth, M., Etcheverry, M. & Martinez-Romero, E. 2011. Analysis of bacterial diversity associated with the roots of Maize (*Zea mays* L.) through culture dependent and culture-independent methods. *International Scholarly Research Network.* doi: 10.5402/2011/938546.
- Roostika, I., Darwati, I. & Megia, R. 2007. Kriopreservasi tanaman purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molck.) dengan teknik vitrifikasi. *Berita Biologi.* 8 (6): 423-431.
- Strobel, G. & Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 67 (4): 491-502.
- Strobel, G. & Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 67 (4): 491-502.
- Tan R.X. & Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod. Rep.* 18: 448-459.
- Utami, U., Soemarno, Sumarno & Risjani, Y. 2008. Aktivitas antibakteri endofit tanaman mangrove terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Penelitian Perikanan.* 11(1): 42-48.
- Wilson W. 2014. Bakteri endofit tanaman Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molck.) berdasarkan karakter morfologis, biokimiawi dan molekular. Tesis.