

**ISOLASI BAKTERI ENDOFIT DARI DAUN SIRIH
(*Piper betle* L.) SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus***

**ISOLATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA FROM *Piper betle* L. LEAVES AS
ANTIBACTERIAL AGAINST *Staphylococcus aureus***

Soni Muhsinin^{1*}, Ida Parida¹, Ira Adiyati Rum¹, Kusnadi²

¹Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana,

²Departemen Biologi, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia

*email: soni.muhsinin@bku.ac.id

Received: 15 November 2019; Revised: 30 Desember 2019; Accepted: Desember 2019; Available online: Desember 2019

ABSTRAK

Infeksi merupakan kondisi yang sering terjadi pada manusia karena penyebarannya yang sangat cepat dan luas. Agen-agen yang menyebabkan infeksi dapat berupa hewan, bakteri, virus atau jamur. Bakteri yang dapat menyebabkan infeksi pada mulut salah satunya ialah *Staphylococcus aureus*. Tanaman daun sirih (*Piper betle* L.) bisa dijadikan salah satu alternatif dalam pengembangan senyawa antibakteri, perolehan senyawa bioaktif dapat dimaksimalkan dengan pemanfaatan bakteri endofit dalam daun sirih. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, identifikasi dan uji aktifitas dari ekstrak metabolit sekunder. Metode yang digunakan adalah eksperimental laboratorium yang meliputi uji aktivitas dengan menggunakan metode mikrodilusi dan gores. Hasil isolasi yang dilakukan di dapat 3 bakteri yang diduga merupakan genus *Brevibacterium* untuk isolat ID 2 dan ID 7 sedangkan *Rarobacter* untuk isolat ID 1. Hasil uji aktivitas terhadap *Staphylococcus aureus* yang dilakukan dengan menggunakan metode mikrodilusi menghasilkan nilai KHM 1024 ppm untuk isolat ID 1, ID 2 dan nilai KHM 16384 untuk isolat ID 7.

Kata kunci : Bakteri endofit, *S.aureus*, daun sirih.

ABSTRACT

Infection is a condition that often occurs in humans since it spreads very fast and wide. Agents that cause the infection can be animals, bacteria, viruses or fungi. Piper betle L. can be used as an alternative in the development of antibacterial compounds, acquisition of bioactive compounds can be maximized by the use of endophytic bacteria in betel leaves. This study aims to isolate, identify and test the activity of the extract of secondary metabolites. The method used is an experimental laboratory that includes the activity test by using microdilution and scratch. Results can do in isolation 3 a suspected bacterial genus Brevibacterium to isolate ID 2 and ID 7 while Rarobacter to isolate ID 1. The test results of activity against S. aureus made using microdilution method produces MIC 1024 to isolate ID 1, ID 2 and MIC 16384 to isolate ID7 .

Keywords : endophytic bacteria, *S. aureus*, *Piper betle* L.

PENDAHULUAN

Infeksi pada manusia merupakan kondisi yang sering terjadi dan penyebarannya cukup luas. Penyakit infeksi bisa menyebabkan penularan, karena dapat berpindah dari satu individu ke individu lain, baik melalui kontak langsung maupun tidak. Agen-agen yang menyebabkan infeksi dapat berupa hewan, bakteri, virus atau jamur (Berríos-Torres *et al.*, 2017).

Bakteri yang dapat menyebabkan infeksi salah satunya ialah *Staphylococcus aureus*. Beberapa di antaranya tergolong flora normal dalam kulit, faring, selaput mukosa manusia dan sering menyebabkan abses, pembentukan *biofilm* pada gigi dan berbagai infeksi lainnya (McCormack *et al.*, 2015). Hasil penelitian mengenai terjadinya infeksi pada mulut, terdapat 334 spesies yang telah diisolasi dan *S.aureus* merupakan spesies paling banyak yaitu 4,64%.

Obat yang digunakan untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh bakteri *S. aureus* adalah penisilin G untuk infeksi yang ringan. Penderita yang alergi terhadap penisilin, dapat diberikan sefalosporin, eritromisin, linkomisin, atau klindamisin (Teow *et al.*, 2016).

Penggunaan tanaman daun sirih ialah salah satu alternatif yang bisa digunakan, karena berdasarkan bukti empiris dari masyarakat bahwa daun sirih bisa untuk pengobatan sakit dan perawatan gigi. Tanaman daun sirih (*Piper betle* L.) bisa dijadikan salah satu alternatif dalam pengembangan senyawa antibakteri, perolehan senyawa bioaktif dapat dimaksimalkan dengan pemanfaatan bakteri endofit dari daun sirih. Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman pada daun, batang dan akar selama periode tertentu dari siklus hidupnya. Bakteri endofit dapat membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya (Muhsinin *et al.*, 2016).

Berdasarkan penelitian sebelumnya terhadap ekstrak daun sirih pada konsentrasi 625 ppm memiliki aktifitas sebagai antibakteri terhadap *S.aureus* dengan 14,67 mm (Hoque *et al.*, 2011). Senyawa antibakteri pada daun sirih adalah fenol (kavikol) yang berperan sebagai toksin dalam protoplasma bakteri, merusak dan menembus dinding serta mengendapkan protein sel bakteri. Pemanfaatan mikroba endofit merupakan teknik pendekatan bioteknologi dalam mengisolasi senyawa aktif. Penelitian lain mengenai mikroba endofit salah satunya ialah isolasi mikroba endofit dari cabai katokon dan juga daun kemangi sebagai antimikroba. Isolasi mikroba endofit memiliki beberapa kelebihan antara lain, lebih cepat menghasilkan dengan mutu yang seragam, dapat diproduksi dalam skala besar dan kemungkinan diperoleh komponen bioaktif baru dengan memberikan kondisi yang berbeda (Verma *et al.*, 2018). Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menguji aktifitas bakteri endofit dari daun sirih (*Piper betle* L.) tersebut terhadap *S.aureus*.

METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental laboratorium, meliputi isolasi bakteri endofit dan uji aktivitas anti bakteri dari hasil fermentasi bakteri endofit. Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap dimulai dengan persiapan bahan dan determinasi, isolasi bakteri endofit (Powthong *et al.*, 2009), skrining bakteri endofit penghasil antibakteri (Fokkema *et al.*, 1959), identifikasi secara morfologi dan biokimia (Pattuju, 2014), fermentasi bakteri endofit (Almeida *et al.*, 2012), pembuatan kurva baku pertumbuhan (Almeida *et al.*, 2012), pemeriksaan golongan senyawa hasil fermentasi (pemeriksaan fenol, pemeriksaan flavonoid, pemeriksaan sterol, pemeriksaan fenol), uji aktivitas antimikroba (pembuatan media, pembuatan suspensi mikroba dan pengujian aktivitas antimikroba dengan mikrodilusi dan difusi (NCCLS, 2003).

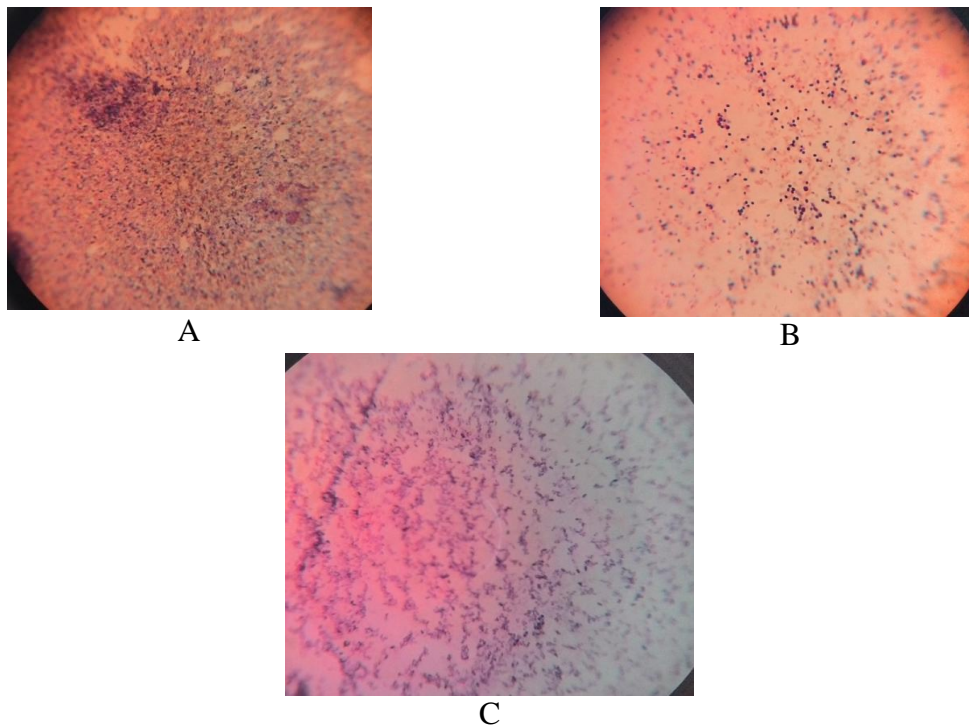
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri endofit yang digunakan adalah metode *spread plate* karena hasil pertumbuhan bakteri endofit yang didapat bisa lebih baik. Tahapan yang dilakukan yaitu dengan cara menghaluskan sampel daun sirih terlebih dahulu lalu disebar di atas permukaan media yang sudah memadat.

Skrining Bakteri Endofit

Skrining bakteri endofit penghasil antibakteri dilakukan untuk memilih dan memastikan isolat bakteri yang menghasilkan antibakteri untuk dapat dilanjutkan ke prosedur selanjutnya. Ketujuh isolat bakteri yang berhasil dimurnikan diberi nama isolat, kemudian dilakukan skrining antibakteri dengan

menggunakan bakteri *S. aureus*. Hasil yang didapatkan pada saat melakukan skrining menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri uji *S. aureus*, hal ini ditandai dengan terbentuknya zona bening. Isolat yang menunjukkan adanya aktivitas adalah ID 1(A), ID 2(B) dan ID 7 (C) yang kemudian dilanjutkan ketahapan identifikasi (Gambar 1 dan tabel 1).



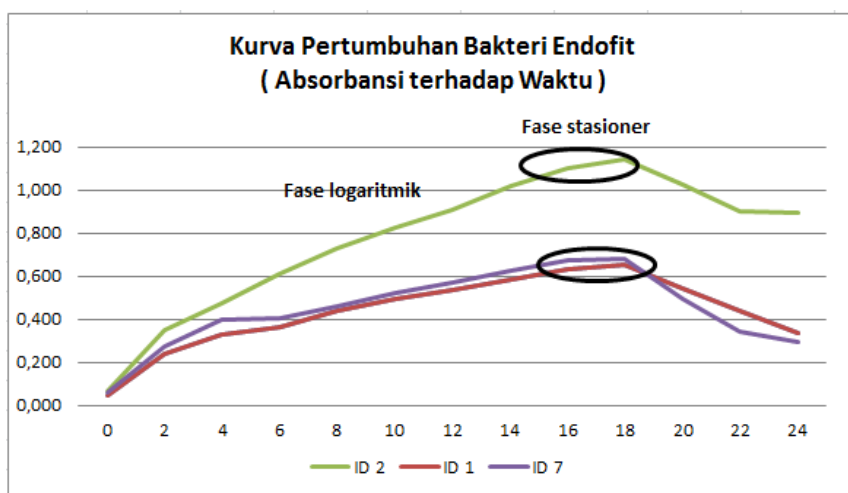
Gambar 1 Hasil pewarnaan Gram isolat ID 1(A), ID 2(B) dan ID 7(C) perbesaran 1000x.

Tabel 1 Data Hasil Uji Biokimia isolat bakteri ID1, ID2 dan ID7.

No	Uji Biokimia	Hasil Uji Masing-Masing Isolat				
		ID1	ID2	ID7	Brevibacterium	Rarobac
1	Motilitas	+	-	-	-	+
2	Indol	-	-	-		-
3	Sitrat	-	-	-		
5	Voges-Proskauer	+	-	-		
5	Hidrolisis Kasein	+	+	+	+	+
6	Hidrolisis Pati	+	+	+		+
7	Katalase	+	+	+	+	+
8	Metyl Red	-	-	-		
9	Fermentasi Laktosa	+(gas)	+(gas)	+(gas)		
10	Fermentasi Dextrosa	+(asam)	+(asam) dan (gas)	+(asam)		+
11	Fermentasi Sukrosa	-	-	-	-	-
12	Hidrolisis Gelatin	+	+	+	+	+

Fermentasi dan Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Fermentasi dilakukan untuk memperoleh metabolit sekunder dari bakteri endofit ID 1, ID 2 dan ID 7. Metabolit sekunder akan terbentuk selama fase stasioner dan pada akhir tahap stasioner ini proses fermentasi harus dihentikan (Mufidah *et al.*, 2013). Fase stasioner diketahui dengan pembuatan kurva pertumbuhan bakteri, yaitu melalui pengukuran absorbansi menggunakan Spektrofotometri UV pada panjang gelombang 530 nm (Elita *et al.*, 2013). Proses fermentasi dan pembuatan kurva pertumbuhan dimulai dengan pembuatan starter yang bertujuan untuk mempercepat fase lag, kemudian fermentasi dilanjutkan untuk memperoleh fase logaritma dan fase stasioner (Mufidah *et al.*, 2013). Media fermentasi yang digunakan yaitu NB (*Nutrient Broth*). NB merupakan medium yang berbentuk cair dengan bahan dasar *beef extract* dan *pepton*. Penggunaan NB sebagai media fermentasi dikarenakan pada proses ini membutuhkan media cair. Media cair harus di *shaker* agar komposisi nutrisi tetap seimbang selama proses fermentasi. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dan proses fermentasi dilakukan secara bersamaan.



Gambar 2 Kurva Pertumbuhan Bakteri
Ket: sumbu x adalah waktu dan y adalah jumlah bakteri

Berdasarkan hasil pengamatan (gambar 2), fase eksponensial dimulai dari jam ke-2 dan berakhir di jam ke-16. Fase stasioner terjadi pada jam ke-16 sampai jam ke-18. Hal ini ditunjukkan dengan kesetimbangan yang dibuktikan melalui absorbansi bakteri pada jam tersebut memberikan hasil yang konstan.

Skrining Metabolit Hasil Fermentasi

Skrining metabolit hasil fermentasi dilakukan untuk memastikan senyawa yang aktif sebagai antibakteri. Skrining yang dilakukan meliputi uji Terpenoid/ Steroid, uji Alkaloid, uji Fenol, uji Saponin, uji Flavonoid, uji Quinon, uji Tanin. Hasil pengujian yang dilakukan pada filtrat hasil fermentasi menunjukkan positif mengandung fenol dan saponin, Sementara pengujian terpenoid/steroid, alkaloid, tanin, quinon, flavonoid menunjukkan hasil negatif, hal ini diduga kandungan senyawa-senyawa tersebut sangat rendah sehingga tidak terdeteksi saat dilakukan pengujian. Uji fenol dilakukan dengan cara menambahkan larutan besi (III) klorida. Ketika suatu fenol ditambahkan larutan besi (III) klorida maka akan menghasilkan perubahan warna menjadi biru-hitam (Fitriyah *et al.*, 2013). Senyawa yang diduga memiliki aktifitas antibakteri ialah fenol. Mekanisme yang diduga yaitu dengan cara merusak dan menembus dinding serta mengendapkan protein sel bakteri, sehingga menyebabkan kematian sel.

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode mikrodilusi. Metode mikrodilusi dapat digunakan untuk menentukan KHM dan KBM. Konsentrasi Hambat minimum (KHM) yaitu konsentrasi terkecil agen antimikroba yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba (Mahon *et al.*, 1995). Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

didefinisikan sebagai konsentrasi terendah yang mampu membunuh seluruh pertumbuhan bakteri dan ditetapkan pada konsentrasi yang memberikan zona jernih tanpa pertumbuhan mikroba pada media Agar dengan pengamatan secara visual (Efendi & Hertiani, 2013).

Hasil pengujian mikrodilusi tersebut dapat dilihat kontrol negatif (kolom pertama) yang hanya berisi media, menunjukkan hasil berupa warna larutan tidak berubah, yang tetap seperti sebelumnya, yang artinya tidak ada pertumbuhan mikroba. Prosedur yang dilakukan pada saat pengujian dapat dikatakan aseptik dan mampu memberikan hasil uji yang benar. Hasil pengujian ID 1 dan ID 2 dapat dilihat bahwa sumur-sumur pada kolom ke 12 larutan menjadi bening, yang artinya pada konsentrasi 1024 ppm dengan larutan induk 2048 ekstrak fermentasi bakteri endofit dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S.aureus*, namun aktivitas sangat lemah. Bakteri endofit untuk ID 7 ekstrak fermentasi bakteri endofit dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S.aureus* pada konsentrasi 16384 ppm dengan larutan induk 32768 ppm, namun dengan aktivitas yang sangat lemah juga.

Hasil uji mikrodilusi yang telah dilakukan menunjukkan bakteri *S.aureus* dapat tumbuh kembali setelah ditanam pada media agar dengan konsentrasi 1024 ppm, 1536 ppm, 2184 ppm, 3456 ppm untuk ID 1 dan ID 2. Konsentrasi yang diunakan untuk ID 7 ialah 16384 ppm, 21840 ppm, 32768 ppm. Pertumbuhan terjadi dimulai dari 1024 ppm untuk ID 1, ID2 dan untuk ID 7 pertumbuhan terjadi pada konsentrasi 16384 ppm. Hasil tersebut menunjukkan ekstrak fermentasi bakteri endofit ID 1, ID 2, dan ID 7 hanya dapat menghambat pertumbuhan bakteri, tetapi tidak membunuh bakteri.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa bakteri endofit dapat diisolasi dari tanaman daun sirih. Bakteri endofit yang hidup dalam daun sirih diduga *Rarobacter* dan *Brevibacterium*. Hasil uji antibakteri menggunakan mikrodilusi menghasilkan nilai KHM 1024 ppm untuk ID 1, ID 2 dan nilai KHM 16384 ppm untuk ID 7.

DAFTAR PUSTAKA

- Almeida, A. A. P., Naghetini, C. C., Santos, V .S.M., Alencar, H., Koo, P. L., Rosalen 2012. Influence of natural coffee compounds, coffee extracts and increased levels of caffeine on the inhibition of *Streptococcus mutans*. *Food Research Internasional* 49 (2012) 459-461.
- Berríos-Torres, S. I., Umscheid, C. A., Bratzler, D. W., Leas, B., Stone, E. C., Kelz, R. R., & Dellinger, E. P. (2017). Centers for Disease Control and Prevention guideline for the prevention of surgical site infection, 2017. *JAMA surgery*, 152(8), 784-791.
- Efendi, Y.N. dan Hertiani, T., 2013, Antimicrobial Potency of ant-plant extract (*Myrmecodia tuberosa* Jack.) against *Candida albicans*, *Escherecia coli*, and *Staphylococcus aureus*, *Trad . Med. J.*,18 (1), 53-58.
- Elita A., Saryono S. dan 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*. 3 (2).
- Fitriyah, D., Jose, C. dan Saryono. (2013): *Skrining Aktivitas Dan Uji Fitokimia Dari Kapang Endofitik Tanaman Dahlia (Dahlia variabilis)*. *J. Ind. Che.Acta Vol. 3 (2)*. Kristiana. 2011. *Populasi Bakteri Endofit Pada Pertanaman Lada (Piper Nigrum L.) Di Propinsi Bangka Belitung Dan Potensinya Sebagai Agensia Hayati*. Skripsi. Departemen Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Fokkema, N.J., J.H. Bond dan H.A. Fribourg. 1959. *Methods for Studying Soil Microflora Plant Desesase Relationship*. Burgess Publ. Co. USA.pp.247.
- Hoque, M. M., Rattila, S., Shishir, M. A., Bari, M. L., Inatsu, Y., & Kawamoto, S. (2011). Antibacterial activity of ethanol extract of betel leaf (*Piper betle* L.) against some food borne pathogens. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 28(2), 58-63.
- Mahon, C.R., and Manuselis, G. 1995. *Staphylococcus aureus* in *Text Book of Diagnostic Microbiology*. Printed in USA, Pp.325-331.
- McCormack, M. G., Smith, A. J., Akram, A. N., Jackson, M., Robertson, D., & Edwards, G. (2015). *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: An overlooked source of carriage and infection?. *American journal of infection control*, 43(1), 35-37.

- Mufidah., Rante, H., Rahim, A., Agustina, R., Pakki., dan Talbani, A. 2013. Aktivitas Antifungi Metabolit Sekunder yang Diisolasi dan *Mezzetia parviflora* Becc. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 17(3), 69-72.
- Muhsinin, S., Budiarto, R.M., Mulyani, L.N. (2016). Isolation of endophytic bacteria from plant basil (*Ocimum sanctum* L.) as antibacterials against staphylococcus aureus. [Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences](#).
- NCCLS. 2003. *Methods for Dillution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically-Sixth Edition: Approved Standard M7-A6*. NCCLS, Wayne, PA, USA.
- Pattuju, S. M. 2014. Identifikasi Bakteri Resisten Merkuri Pada Urine, Feses Dan Kalkulus Gigi Pada Individu Di Kecamatan Malalayang, Manado, Sulawesi Utara. *Jurnal e-Biomedik (eBM)*, Volume 2, Nomor 2, Juli 2014.
- Powthong, P., Jantrapanukorn, B., Thongmee, A., and Suntornthiticharoen.2009. Evaluation of Endophytic Extract for Their Antimicrobial Activity From *Sesbania Grandiflora* (L.) Pers. *Pharmaceutical and Biomedical Research*. ISSN No: 0976-0350.
- Teow, S. Y., Liew, K., Ali, S. A., Khoo, A. S. B., & Peh, S. C. (2016). Antibacterial action of curcumin against *Staphylococcus aureus*: a brief review. *Journal of tropical medicine*, 2016.
- Verma, S. K., Kingsley, K., Bergen, M., English, C., Elmore, M., Kharwar, R. N., & White, J. F. (2018). Bacterial endophytes from rice cut grass (*Leersia oryzoides* L.) increase growth, promote root gravitropic response, stimulate root hair formation, and protect rice seedlings from disease. *Plant and soil*, 422(1-2), 223-238.