

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

Desi Sagita¹ Netty Suharti², Nur Azizah³

^{1,3}Program Studi Farmasi, STIKES Harapan Ibu, Jambi

²Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Kampus Limau Manis, Padang

Email : stikesharapanibu@gmail.com

Submission: 11-4-2017, Reviewed: 12-4-2017, Accepted 17-4-2017

<https://doi.org/10.22216/jit.2017.v11i1.459>

Abstract

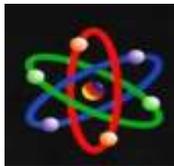
Endophytic bacteria becomes one of the producers of alternative antimicrobial compounds . The existence of bacteria in plant makes it produce bioactive like host plants. This research aims to isolate and identified endophytic bacteria which have ability to against bacteria Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Antibacterial activity test carried out by the method of Kirby Baure . Piper betle is plant that has been used for many people which contain many compound for health. The number endophytic bacteria that has been isolated are thirteenth isolate. Those isolates are E1, E2 , E3 , E4 , E7, E8, E9, E 10, E 11, E12 and E13. Based on antimicrobial activity 6 of 13 isolated endofit have potential activity. They were 5 of isolated endophytic bacteria inhibited against to Staphylococcus aureus and isolate E8 gives higher activity with diameter of clear zone is 18.96 mm and 1 of isolate is E7 can inhibit against to Escherichia coli with diameter clear zones is 14.01 mm.

Keywords : Endophytic bacteria; Piper betle L; antimikrobia; Escherichia coli; Staphylococcus aureus

Abstrak

*Bakteri endofit adalah salah satu alternatif penghasil senyawa antimikroba. Keberadaan bakteri dalam tanaman memungkinkan bakteri menghasilkan senyawa bioaktif yang sama seperti yang terkandung dalam tanaman inangnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri endofit yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri lainnya. Aktifitas antibakteri diukur menggunakan metode Kirbi Bauer. Sirih (*Piper betle*) adalah tanaman yang telah digunakan oleh banyak orang karena mengandung senyawa yang baik untuk kesehatan. Jumlah bakteri endofit yang berhasil diisolasi adalah 13 isolat yaitu E1, E2, E3, E4, E7, E8, E9, E10, E11, E12 dan E13. Berdasarkan uji aktifitas antibakteri, 6 dari 13 isolat endofit yang berpotensi memberikan aktifitas antibakteri. 5 dari isolat tersebut yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan E8 yang aktifitas nya tinggi dengan diameter zona bening 18.96 mm dan hanya 1 isolat yaitu E7 yang mampu menghambat *Escherichia coli* dengan diameter zona bening 14.01 mm.*

Kata kunci : Bakteri endofit; Piper betle L; antimikroba; Escherichia coli, Staphylococcus aureus



PENDAHULUAN

Mikroba endofit adalah organisme hidup yang berukuran mikroskopis yang hidup di dalam jaringan tanaman (*xylem* dan *phloem*), daun, akar, buah, dan batang (Strobel G, Daisy B. 2003). Mikroba ini hidup bersimbiosis saling menguntungkan dengan tanaman dimana mikroba ini memanfaatkan nutrisi dari hasil metabolime tanaman untuk hidup. Selain itu mikroba endofit juga memberikan keuntungan terhadap tanaman yang ditumpangnya seperti memproteksi tanaman melawan herbivora, serangga, atau jaringan yang pathogen serta mampu menstimulasi pertumbuhan tanaman.

Pemanfaatan mikroba endofit dalam memproduksi senyawa aktif memiliki beberapa kelebihan, antara lain (1) dapat diproduksi dalam skala besar dan (2) kemungkinan diperoleh komponen bioaktif baru dengan memberikan kondisi yang berbeda (Tanaka Met al, 1999).

Sirih (*Piper betle* L.) adalah jenis tanaman merambat yang telah lama diketahui dan digunakan secara turun temurun untuk pengobatan obat batuk, sakit gigi, penyegar dan sebagainya. Bagian-bagian dari tanaman sirih seperti akar, biji, dan daun berpotensi untuk pengobatan, tetapi yang paling sering dimanfaatkan adalah bagian daunnya. Pemanfaatan sirih sebagai pengobatan tradisional ini disebabkan adanya sejumlah zat kimia yang mempunyai aktivitas sebagai senyawa, antiplatelet (Chang, MC. et al. 2007), antiinflamasi (Santhakumari Pet al.2006) dan antimikroba(Sharma S.

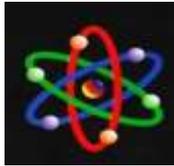
et al.2009). Banyak senyawa bioaktif yang sudah di isolasi dari tanaman sirih diantaranya *Allylpyrocatechol*(Tripathi S. 2008), *piperbetol*, *methylpiperbetol*, *piperol A and piperol* (Zeng HW.et al. 1997), *Hydroxychavicol* (HC) (Murata K. et al.2009).

Untuk mengambil senyawa aktif dalam tanaman maka perlu dilakukan ekstraksi tanaman tersebut dalam jumlah besar sehingga cara ini kurang efisien. Mikroba endofit yang ada di dalam tanaman tersebut bisa dimanfaatkan untuk ekstraksi senyawa bioaktif di dalamnya.

Pada penelitian ini dilakukan dengan mengisolasi bakteri endofit pada daun sirih (*Piper battle* L.). Kemudian Identifikasi isolat bakteri dilakukan secara makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia. Untuk uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dilakukan dengan metode uji Kirby-Bauer menggunakan kerta cakram.

BAHAN DAN METODE

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laminar *air flow cabinet* (KOJAIR[®]),*autoklav* (HIRAYAMA[®]), Mikroskop (OLYMPUS[®]), cawan petri (Pyrex[®]), jarum ose, *hotplate*(MITSEDA[®]), bunsen, vortex (Thermo[®]), pengaduk kaca, pinset,kertas perkamen, inkubator (Mimmert[®]), *aluminium foil*, *cover glass*, objekglas, gelas ukur (Pyrex[®]), tabung reaksi (Pyrex[®]), erlenmayer (Pyrex[®]), Pipet mikro (Eppendorf Research plus[®]), *shakerincubator* (WiseCube[®]),sentrifugasi (Hettich[®]),



jangka sorong, timbangan analitik(Shimadzu[®]) dan silet.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media NA (*nutrient agar*), media NB (*Nutrien Brothi*), media MHA (*Mueller Hinton Agar*), media MHB (*Mueller Hinton Broth*), Nystatin, larutan NaOCl 1 %, larutan KOH 3 %, daun sirih (*Piper betle L.*), aqua steril, spirtus, kapas, biakan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*, alcohol 70 %, kloramfenikol, kertas saring Whatman dan tisu.

Isolasi bakteri endofit

Bakteri endofit diisolasi dari tanaman sirih (*P. betle L.*) yang diambil dari daunnya. Bagian daun sirih tersebut dicuci dengan air mengalir selama 5 menit. Setelah pencucian, dilakukan sterilisasi permukaan dengan memasukkannya ke dalam larutan alcohol 70 % selama 5 menit, dilanjutkan kedalam larutan NaOCl 1 % selama 5 menit kemudian dikeringkan dengan tissue steril setelah itu dibilas dengan aquadest steril \pm 1 menit diulang dua kali. lalu ditempelkan di atas cawan petri yang berisi media NA, perlakuan ini berfungsi sebagai kontrol. Kemudian daun sirih dikeringkan diatas kertas tissue steril dan dipotong menjadi beberapa bagian kecil dengan ukuran \pm 3 cm. Potongan daun yang telah disterilkan tersebut kemudian diletakkan pada media NA yang telah ditambahkan Nystatin (0,01%) sebagai antifungi. Selanjutnya sampel diinkubasi selama 2-14 hari pada suhu 27-29 °C. Kemudian bakteri endofit tersebut diisolasi dan dimurnikan pada media NA baru.

Pemurnian ini bertujuan untuk memisahkan koloni endofit yang memiliki morfologi yang berbeda satu dan yang lainnya. Bakteri endofit yang digunakan untuk penelitian adalah bakteri yang tumbuh pada belahan daun bagian dalam.

Identifikasi isolat bakteri endofit

Terhadap koloni yang tumbuh pada media NA, kemudian dilakukan identifikasi bakteri berdasarkan pengamatan morfologi koloni, uji pewarnaan gram dan uji biokimia

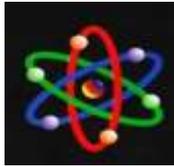
Seleksi bakteri endofit penghasil metabolit antibakteri

a. Fermentasi bakteri endofit

Fermentasi bakteri endofit dilakukan dengan menumbuhkan isolat endofit pada media cair *Mueller-Hinton Broth* (MHB) dan diinkubasi pada suhu 37 °C pada incubator goyang (incubator shaker) 130 rpm selama 48 jam. Kultur yang sudah di fermentasi selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3800 rpm selama 20 menit. Pisahkan supernatant dari pellet sel. Supernatant yang diambil digunakan untuk pengujian antibakteri terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylocoiccus aureus*.

b. Persiapan bakteri uji

Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* yang mewakili gram negative dan *Staphylococcus aureus* yang mewakili gram positif. Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri uji yang telah distandarisasi sesuai



dengan standar Mc.Farland 0.5 (setara dengan 1.5×10^8)

c. Uji anti bakteri isolat endofit terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

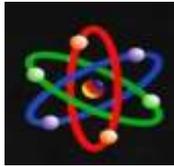
Uji aktivitas antibakteri isolat endofit terhadap bakteri uji dilakukan dengan metode uji *Kirby-Bauer* menggunakan kertas cakram. Secara aseptik, kertas cakram yang sudah disterilkan dicelupkan ke dalam larutan uji yang mengandung isolat endofit dan didiamkan selama 30 menit. Sebagai kontrol positif digunakan kloramfenikol 0.3% dan aquades digunakan sebagai kontrol negatif. Hasil tersebut lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Setelah masa inkubasi selesai dilakukan pengamatan terhadap zona bening yang terbentuk dan diukur diameternya. Sampel yang mempunyai potensi menghasilkan zat antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona jernih.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih. Pada sampel daun sirih yang telah diambil, dilakukan sterilisasi permukaan dengan tujuan agar tidak

ada bakteri kontaminan. Daun sirih yang telah diisolasi dan diinkubasi dalam medium NA telah menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri endofit pada daun sirih. Pada saat mengisolasi bakteri endofit ini juga ditambahkan nistatin yang merupakan antifungi. Tujuan penambahan nistatin ini adalah untuk mengoptimalkan hasil pengamatan dan menjamin bahwa hanya bakteri yang akan tumbuh pada media NA. bakteri endofit dapat ditumbuhkan dalam media NA dikarenakan media Na adalah media umum yang mana hampir semua bakteri bisa tumbuh. Kandungan nutrisinya yang kompleks menyebabkan bakteri tersut bisa tumbuh pada media NA. Dengan tumbuhnya bakteri endofit yang ada pada daun sirih tersebut membuktikan bahwa bakteri endofit dapat ditemukan pada jaringan tanaman sirih dimana bakteri tampak tumbuh disebelah dalam belahan daun. Bakteri endofit bisa masuk melalui akar, batang dan daun. Mikroorganisme ini dapat tumbuh di dalam pembuluh vaskuler atau di ruang intersel (Zinniel DK *et al.* 2002).

Isolat bakteri yang didapatkan sebanyak 13 isolat yang di berilabel E1-E13 kemudian dimurnikan di media NA (tabel 1).

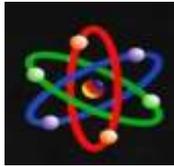


Tabel 1. Hasil isolat endofit dari daun sirih (*Piper bettle L*)

Isolat	Pemeriksaan Makroskopis				
	Warna	Bentuk	Sifat Permukaan	Elevasi	Pinggiran
E1	Putih	Iregular	Halus mengkilap	Cembung	Rata
E2	Kuning	Bulat kecil	Halus mengkilap	Cembung	Rata
E3	Putih	Bulat kecil	Halus mengkilap	Cembung	Rata
E4	Kuning	Bulat kecil	Halus mengkilap	Cembung	Rata
E5	Putih	Bulat kecil	Halus mengkilap	Cembung	Rata
E6	Putih	Bulat kecil	Halus mengkilap	Cembung	Rata
E7	Kuning	Iregular	Halus mengkilap	Cembung	Rata
E8	Putih	Bulat kecil	Halus mengkilap	Cembung	Rata
E9	Putih	Bulat kecil	Halus mengkilap	Cembung	Rata
E10	Putih	Iregular	Halus mengkilap	Cembung	Rata
E11	Putih	Iregular	Halus mengkilap	Cembung	Rata
E12	Kuning	Bulat besar	Halus mengkilap	Cembung	Rata
E13	Putih	Iregular	Halus mengkilap	Cembung	Rata

Secara makroskopis dapat dilihat bentuk koloni dari isolat ada yang bulat kecil, bulat besar dan iregular, untuk pinggiran rata, warna putih dan kuning, elevasi cembung, sifat permukaan mengkilap. Hal ini sesuai dengan Bhore dan Sathisha (2010) yang menyatakan bahwa bakteri endofit pada satu tanaman inang umumnya terdiri atas beberapa genus

dan spesies (Bhore SJ, Sathisha G. 2010). Isolat tersebut selanjutnya diidentifikasi secara mikroskopis terkait pewarnaan gram dan uji biokimia. Hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa isolat bakteri E1,E2,E3,E4,E5,E6,E8,E9 dan E12 merupakan bakteri gram negatif dan isolat bakteri E7,E10,E11 dan E13 merupakan bakteri gram positif.



Seluruh isolat endofit yang didapatkan memiliki bentuk basil

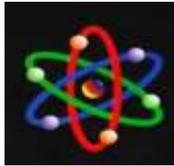
Tabel 2. Hasil uji biokimia isolat endofit

Isolat \ Uji	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13
Gram	(-) Basil	(-) Basil	(-) Basil	(-) Basil	(-) Basil	(-) Basil	(+) Basil	(-) Basil	(-) Basil	(+) Basil	(+) Basil	(-) Basil	(+) Basil
TSIA	k/a	k/a	k/a	k/a	k/a	k/a		k/a	k/a			k/a	
Sulfit	-	-	-	-	-	-		-	-			-	
Indol	-	-	-	-	-	-		-	-			-	
Motilitas	+	+	+	+	+	+		+	+			+	
Spora							-			-	-		-
BTA							-			-	-		-
Katalase							+			+	+		+

Pewarnaan gram dilakukan untuk menentukan apakah bakteri tersebut gram positif atau negatif. Untuk gram positif, akan memberikan warna ungu, hal ini disebabkan Karena dinding sel bakteri ini tersusun atas peptidoglikan yang tebal, sehingga bakteri gram positif mengalami denaturasi protein pada dinding selnya akibat pencucian dengan alkohol. Protein menjadi keras dan beku, pori-pori mengecil dan permeabilitas dinding sel berkurang sehingga kompleks Kristal violet yang berwarna ungu dipertahankan dan bakteri akan tetap berwarna ungu. Sedangkan bakteri gram negatif akan memberikan warna merah karena lipid yang terdapat didalam dinding selnya akan larut pada waktu pencucian dengan alkohol sehingga pori-pori dan dinding sel akan membesar dan menyebabkan terlepasnya kompleks

Kristal violet yang diserap sebelumnya dan bakteri akan berwarna merah setelah diberikan safranin (Brown, A. 2001). Setelah dilakukan pewarnaan gram selanjutnya dilakukan uji biokimia. Uji biokimia dilakukan berdasarkan pada berbagai hasil metabolisme yang disebabkan oleh daya kerja enzim. Untuk bakteri gram negatif dilakukan uji TSIA, uji SIM dan uji sitrat dan bakteri gram positif dilakukan uji pewarnaan spora dan uji katalase (Tabel 2). Selama melakukan metabolisme hidup mikroorganisme menghasilkan senyawa sampingan yang bisa dimanfaatkan untuk proses identifikasi mikroorganisme tersebut.

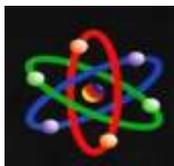
Hasil penapisan antibakteri isolat endofit dari daun sirih terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* didapatkan 6 isolat yang mempunyai aktivitas antibakteri yaitu isolat E1, E2, E3,



E4, E7 dan E8. Dari hasil uji aktivitas antibakteri dari isolat endofit tersebut ada 1 isolat yaitu E7 yang memberikan zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan 5 isolat endofit yaitu E1, E2, E3, E4, E8 yang memberikan zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (tabel 3). Terbentuknya daerah bening di sekitar koloni isolat bakteri endofit mengindikasikan kemungkinan adanya senyawa antibakteri yang dihasilkan dari isolat endofit yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji. Hal ini sama seperti yang dilakukan oleh Purwanto *et al* (2014) yang mendapatkan 3 isolat endofit dari tanaman sirih hijau yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen (Purwanto, *et al*2014). Interaksi isolat endofit dan tanaman merupakan bentuk simbiosis mutualisme dimana bakteri endofit mendapatkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman dan melindungi

tanaman dalam melawan patogen sedangkan tanaman mendapatkan derivat nutrisi dan senyawa aktif yang diperlakukan selama hidupnya (Purwanto, *et al*2014).

Berdasarkan metode Davis stout kekuatan antibakteri dapat ditentukan sebagai berikut: daerah hambatan 20 mm atau lebih mempunyai potensi antibakteri “sangat kuat”, daerah hambatan 10 mm-20 mm mempunyai potensi antibakteri “kuat”, daerah hambatan 5-10 mm mempunyai potensi antibakteri “sedang” dan daerah hambatan 5 mm atau kurang mempunyai potensi antibakteri “lemah” (Setyaningsih, I. 2008). Jika dilihat dari diameter zona hambat, isolat E7 memberikan aktifitas antibakteri paling kuat dibanding isolat endofit lainnya dengan diameter 18.96 mm. Isolat E7 hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.



Tabel 3. Diameter zona hambat yang terbentuk dari uji antibakteri isolat endofit dari daun sirih terhadap bakteri uji

Kode Isolat	Diameter zona hambat (mm)	
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
K -	-	-
K +	37,05	32,57
E1	-	11,21
E2	-	9,73
E3	-	10,11
E4	-	9,8
E5	-	-
E6	-	-
E7	18,96	-
E8	-	14,01
E9	-	-
E11	-	-
E12	-	-
E13	-	-

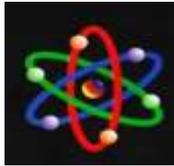


Gambar 1. Hasil Uji Antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*

SIMPULAN

Bakteri endofit berhasil diisolasi dari daun sirih (*Piper betle* L.), sebanyak 13 isolat bakteri. 6 isolat diantaranya yang diberi label

E1, E2, E3, E4, E7 dan E8 menunjukkan hasil positif sebagai antibakteri, ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening. Dari 6



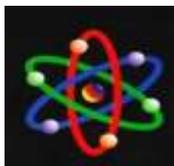
isolat yang menunjukkan aktivitas antibakteri, 1 isolat diantaranya memiliki aktivitas terhadap bakteri. Mengidentifikasi lanjut isolat endofit dari daun sirih tersebut. Melakukan uji lanjutan tentang senyawa

Escherichia coli dan 5 isolat memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. metabolit sekunder antibakteri yang dihasilkan oleh endofit

senyawa antibakteri. *Current Biochemistry*, Vol 1(1): 51-57.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhore SJ, Sathisha G. 2010. Screening of endophytic colonizing bacteria for cytokinin-like compounds: crude cell-free broth of endophytic colonizing bacteria is unsuitable in cucumber cotyledon bioassay. *World J. Agric. Sci.* 6 (4): 345-352
- Brown, A. 2001. Benson : *Microbiological Applications Lab Manual*. 8th Ed. New York: The Mc Graw-Hill Companies.
- Chang, M.C. et al., 2007. Hydroxychavicol, a novel betel leaf component, inhibits platelet aggregation by suppression of cyclooxygenase, thromboxane production and calcium mobilization. *British journal of pharmacology*, 152(1), pp.73-82.
- Murata, K. et al., 2009. Hydroxychavicol: A potent xanthine oxidase inhibitor obtained from the leaves of betel, *Piper betle*. *Journal of Natural Medicines*, 63(3), pp.355-359.
- Purwanto, UMS, Fachriyan HP, Maria B. 2014. Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle* L) dan Potensinya sebagai Penghasil
- Santhakumari, P., Prakasam, A. & Pugalendi, K. V, 2006. Antihyperglycemic Activity of *Piper betle* Leaf on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Medicinal Food*, 9(1), pp.108-112.
- Setyaningsih, I. 2008. Ekstraksi Senyawa Antibakteri dari Diatom *Chaetoceros gracilis* dengan Berbagai Metode. *Jurnal Biologi Indonesia*. 5(1) : p 23 - 33.
- Sharma, S. et al., 2009. Evaluation of the antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of hydroxychavicol for its potential use as an oral care agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1), pp.216-222.
- Strobel, G. & Daisy, B., 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR*, 67(4), pp.491-502
- Tanaka, M. et al., 1999. Isolation, screening and phylogenetic identification of endophytes from plants in Hokkaido Japan



- and Java Indonesia. *Microbes and Environments*, 14, pp.237–241
- Tripathi S. 2008. Chemical investigation of betel vine (*Piper betle* L) as antioxidant agent [Ph D thesis]. Lucknow University, Lucknow.
- Murata, K. et al., 2009. Hydroxychavicol: A potent xanthine oxidase inhibitor obtained from the leaves of betel, *Piper betle*. *Journal of Natural Medicines*, 63(3), pp.355–359.
- Santhakumari, P., Prakasam, A. & Pugalendi, K. V, 2006. Antihyperglycemic Activity of *Piper betle* Leaf on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Medicinal Food*, 9(1), pp.108–112.
- Strobel, G. & Daisy, B., 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 67(4), pp.491–502.
- Zeng, H.W. et al., 1997. Piperbetol, methylpiperbetol, piperol A and piperol B: a new series of highly specific PAF receptor antagonists from *Piper betle*. *Planta Med*, 63(4), pp.296–298.
- Zinniel, D.K. et al., 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), pp.2198–2208