

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT PENGHASIL ANTIBAKTERI DARI DAUN TANAMAN BINAHONG (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

Isolation and Identification of Endophytic Bacteria Producing Antibacterial Compounds From Anredera Cordifolia (Ten.) Steenis Leaf

Fenni Nursulistyarini, Erny Qurotul Ainy

UIN Sunan Kalijaga, Yogyakarta

E-mail :fennynursulis@yahoo.co.id

Abstract - Plants Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) is known as a medicinal plant by the community. Purpose of this study was to obtain endophytic bacteria producing antibacterial isolates from leaves binahong and continued with the characterization and identification of isolates. Antibacterial activity was determined using the paper disc assay method on the media NA is by using the supernatant of endophytic bacteria isolates tested on pathogenic bacteria *Escherichia coli* ATCC 35216 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29 523. Retrieved 9 bacterial isolates and 3 of them are isolates E5, E7, and E8 was selected as superior isolates were able to inhibit the growth of test bacteria . Results identification of isolates using the matching profile showed that isolates E5, E7, E8 respectively including members of the genus *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, and *Bacillus*.

Keywords: *isolation, identification, endophytic bacteria, binahong (Anredera cordifolia* (Ten.)

PENDAHULUAN

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman dan berkoloni pada daerah ruang interseluler dan sistem vascular (Hallman *et al.*, 1997). Bakteri endofit dapat diisolasi dari bagian akar, batang, dan daun (Barac *etal*, 2004). Hallman dan Berg (2006) menyatakan bahwa tanaman mendapat manfaat dengan adanya bakteri endofit seperti memacu pertumbuhan tanaman karena bakteri endofit mampu meningkatkan ketersediaan nutrisi dan menghasilkan hormon pertumbuhan. Bakteri endofit juga mampu meningkatkan resistensi tanaman terhadap berbagai macam mikroba patogen dengan cara menginduksi ketahanan tanaman yang dikenal dengan *induced systemic resistance* (ISR) sehingga mampu bertahan terhadap serangan penyakit tanaman.

Bakteri endofit dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri, antifungi, antivirus, antikanker, antidiabetes, antimalaria, dan antiimunopresif (Strobel *et al.*, 2003). Pemanfaatan bakteri endofit sebagai agensia *biofactory* berbagai senyawa aktif

ini sangat menguntungkan karena siklus hidup mikroba yang lebih singkat dibandingkan siklus hidup tumbuhan inangnya sehingga dapat menghemat waktu produksi dan jumlah senyawa antibakteri yang diproduksi dapat dibuat dalam skala besar tanpa menggunakan ruang yang luas. Keuntungan lain yang diperoleh dari pengembangan bakteri endofit penghasil antibakteri adalah dapat menjaga kelestarian tumbuhan obat, terutama jenis tumbuhan yang langka, agar tidak dieksploitasi secara terus menerus yang akhirnya akan mengakibatkan kepunahan (Prihatiningtias, 2006).

Eksplorasi bakteri endofit telah banyak dikaji antara lain Fauzana (2011) memperoleh 15 isolat bakteri endofitik dari daun tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav), yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus*. Simamarta (2007) berhasil mengisolasi 38 isolat bakteri dan kapang endofit dari tanaman sambung nyawa yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp, *B. subtilis*, dan *C. albicans*. Sedangkan untuk kapang endofit yang



diperoleh mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *C. albicans* dan *B. subtilis*.

Isolasi dan karakterisasi bakteri merupakan tahap awal dalam pengembangan bakteri endofit penghasil senyawa antibakteri. Isolasi tersebut dapat dilakukan dari tanaman obat yang banyak digunakan di masyarakat seperti tanaman obat binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.)). Darsana, (2012) melakukan penelitian terhadap perasan daun binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) steenis) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*. Bagian tanaman binahong yang biasa digunakan sebagai bahan obat oleh masyarakat adalah daun. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktifitas antibakteri isolat bakteri endofit yang diisolasi dari daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.)) dan melakukan karakterisasi dan identifikasi isolat bakteri endofit unggul yang berpotensi sebagai antibakteri dengan menggunakan metode *profile matching*.

METODE PENELITIAN

Isolasi dan Purifikasi Bakteri Endofit dari Daun Binahong

Daun Binahong dicuci kemudian berturut-turut direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit, larutan sodium hipoklorit 3% selama 4 menit dan dibilas dengan akuades steril 5 kali,. Daun kemudian dihancurkan dengan mortar steril. Sebanyak 1 gram daun yang telah dimortar diencerkan dengan akuades steril hingga pengenceran 10^{-5} dan diinokulasikan dalam medium NA dengan metode *pour plate* secara aseptis dan diinkubasi selama 4-7 hari pada suhu 37°C (Zinniel *et al.* 2002). Koloni berbeda yang tumbuh pada medium NA dipurifikasi dengan metode *streak plate*, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C sampai didapat kultur murni.

Seleksi Isolat Bakteri Endofit Penghasil Antibakteri dari Daun Binahong

Seleksi isolat bakteri endofit penghasil antibakteri dilakukan dengan menginokulasi isolat murni pada medium NB. Kultur kemudian dirotasi dengan kecepatan 80 rpm pada suhu 27°C selama 24 – 48 jam. Sel dipisahkan dengan *centrifuge* kultur dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 menit. Supernatan dan pellet kemudian dipisahkan. Supernatan digunakan untuk pengujian komponen antibakteri yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen *E. coli* ATCC 35216 dan *S. aureus* ATCC 29523. Uji antibakteri dilakukan dengan teknik *paper disc diffusion*. *Paper disc* steril yang berdiameter 5 mm direndam selama 2 menit dalam supernatant, dan selanjutnya disentuhkan pada tepi tabung untuk menghilangkan eksek air. *Paper disc* kemudian diletakkan pada medium yang sebelumnya telah diinokulasikan dengan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Keberadaan zona jernih di sekitar *paper disc* menunjukkan adanya aktivitas penghambatan oleh bakteri endofit. Isolat yang membentuk zona jernih paling luas dikarakterisasi lebih lanjut secara fenotipik dengan metode *Profile Matching*.

Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Endofit Terpilih dari Daun Binahong

Karakterisasi fenotipik yang diujikan pada penelitian ini meliputi pengamatan makroskopis, mikroskopis, biokimiawi dan fisiologis. Data karakter fenotipik isolat bakteri diberi skor, yaitu positif (+) untuk unit karakter yang positif dan negatif (-) untuk unit karakter yang negatif. Selanjutnya dibuat kontruksi dendogram berdasarkan nilai matrik Similaritas. Perhitungan matriks similaritas ditentukan dengan 2 cara yaitu *Simple Matching Coefficient* (S_{sm}) dan *Jaccard*



Coefficient (S_j). Klasifikasi strain (OTU) berdasarkan nilai indeks similaritas menggunakan S_{SM} , data dalam matriks $n \times t$ kemudian dianalisis secara kuantitatif dengan program MVSP (*Multivariate Statiscal Package*) versi 3.1. Alogaritma pengklasteran yang digunakan adalah *Average linkage* atau UPGMA (Priest & Austin, 1993). Selanjutnya isolat bakteri endofit yang berpotensi paling efektif sebagai penghasil antibakteri dikarakterisasi dan diidentifikasi berdasarkan karakter fenotipiknya dengan metode *Profile Matching* menggunakan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (holt et al 1994)

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1.1. Hasil Isolasi Bakteri Endofit dari Daun Binahong

Diperoleh 9 isolat bakteri endofit dari daun binahong yaitu isolat $E_1, E_2, E_3, E_4, E_5, E_6, E_7, E_8$ dan E_9 dengan karakter morfologikoloni dan sel seperti disajikan pada Tabel 1. Sebagian besar isolat bakteri memiliki bentuk koloni *irregular*, elevasi *raised*, tepi *undulate* dan berwarna putih tulang. Bentuk sel isolat endofit cukup beragam, tetapi empat isolat diantaranya memiliki bentuk sama yaitu basil bendek. Susunan sel isolat endofit tampak tunggal dan berpasangan, semua isolat motil, 2 isolat menunjukkan reaksi Gram Negatif dan 7 di antaranya termasuk kelompok Gram positif.

Tabel 1. Karakterisasi Morfologi Isolat Bakteri Endofit Penghasil Antibakteri dari Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis).

Kode isolat	Karakter morfologi isolate								
	Bentuk	Elevasi	Tepian	Warna	Bentuk sel	Susunan sel	Gram	Motilitas	Endospora
E1	<i>Irregular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>	Putih tulang	Kokus	Tunggal	Negatif	Motil	Negatif
E2	<i>Irregular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>	Krem	Basil	Tunggal	Positif	Motil	Positif
E3	<i>Irregular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>	Putih tulang	Basil	Berpasangan	Positif	Motil	Negatif
E4	<i>Irregular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>	Putih tulang	Oval	Berpasangan	Positif	Motil	Negatif
E5	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>	Krem	Oval	Tunggal	Positif	Motil	Negatif
E6	<i>Irregular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>	Krem	Kokus	Tunggal	Positif	Motil	Negatif
E7	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>	Putih tulang	Basil	Berpasangan	Negatif	Motil	Negatif
E8	<i>Irregular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>	Putih tulang	Basil	Berpasangan	Positif	Motil	Positif
E9	<i>Irregular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>	Krem	Basil	Tunggal	Positif	Motil	Negatif

1.2. Hasil Seleksi Isolat Bakteri Endofit Penghasil Antibakteri dari Daun Binahong

Supernatan dari 9 isolat bakteri endofit diuji kemampuannya dalam

menghambat pertumbuhan bakteri uji *E. coli* ATCC 35218 dan *S. aureus* ATCC 2952. Indikasi adanya hambatan ditunjukkan dengan pembentukan zona jernih disekitar *paperdisc*



Tabel 2. Seleksi Bakteri Endofit Penghasil Antibakteri dari Daun Binahong (*A. cordifolia*(Ten)

Kode Isolat	Diameter zona hambat (mm)	
	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>S. aureus</i> ATCC 29523
E ₁	-	9,5
E ₂	-	9,5
E ₃	7,5	-
E ₄	-	7
E ₅	-	10
E ₆	-	7,5
E ₇	12	-
E ₈	10,5	9
E ₉	9	9,5

Tabel 2 menunjukkan bahwa sembilan isolat yang mampu menghasilkan antibakteri memiliki diameter zona hambat berkisar antara 7,5 mm sampai 12 mm. Selanjutnya dipilih tiga isolat yang menunjukkan aktivitas penghambatan lebih besar dari 9 mm, yaitu E₅, E₇ dan E₈ yang secara berturut-turut masing - masing menunjukkan aktivitas penghambatan terbesar pada pertumbuhan bakteri uji

E. coli ATCC 35218. *S. aureus* ATCC 2952 dan kedua jenis bakteri uji.

1.3. Hasil Karakterisasi dan Identifikasi Tiga Isolat Bakteri Endofit Terpilih dari Daun Binahong

Hasil uji karakter fenotipik yang meliputi uji biokimiawi, fisiologis, pengamatan makroskopis, mikroskopis dari 3 isolat bakteri terpilih selanjutnya disusun dalam matriksnxt dan ditampilkan dalam tabel 3

Tabel 3. Hasil Uji Karakter Fenotipik dan Matriks n x t Isolat Bakteri Endofit Terpilih dari Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) Penghasil Antibakteri

Karakter	Karakter fenotipik			Matriks n x t		
	E ₅	E ₇	E ₈	E ₅	E ₇	E ₈
Morfologi koloni :						
Bentuk koloni	Circular	Circular	Irregular	+	+	-
Warna koloni	Krem	Putih Tulang	Putih Tulang	-	+	+
Tepi koloni	Entire	Entire	Undulate	+	+	-
Elevasi	Raised	Convex	Raised	+	-	+
Permukaan	Mengkilat	Mengkilat	Mengkilat	+	+	+
Struktur dalam	Opaque	Opaque	Transparan	+	+	-
Morfologi Sel:						
Bentuk sel	Kokus	Basil	Basil pendek	-	+	+
Susunan sel	Tunggal	Berpasangan	Berpasangan	-	+	+
Sifat Gram	+	-	+	+	-	+
Motilitas	+	+	+	+	+	+
Endospora	-	-	+	-	-	+
Biokimiawi:						
Katalase	+	+	+	+	+	+
Oksidase	-	+	+	-	+	+
Hidrolisis Pati	-	-	+	-	-	+
Hidrolisis Sitrat	+	+	-	+	+	-
Penghasil asam dari:						
Glukosa	+	-	-	+	-	-
Laktosa	+	-	-	+	-	-
Maltosa	+	-	-	+	-	-
Sukrosa	+	-	-	+	-	-
Mannitol				+	-	-
Penghasil Gas dari:						
Glukosa	+	-	-	+	-	-

Laktosa	+	-	-	+	-	-
Maltosa	+	-	-	+	-	-
Sukrosa	+	-	-	+	-	-
Mannitol	+	-	-	+	-	-
Fisiologis:						
Suhu 5°C	+	+	+	+	+	+
Suhu 37°C	+	+	+	+	+	+
Suhu 50°C	+	+	+	+	+	+
pH 4	+	+	+	+	+	+
pH 7	+	+	+	+	+	+
pH 10	+	+	+	+	+	+
Kebutuhan O ₂	Fakultatif anaerob	Aerob	Fakultatif Anaerob	+	-	+
NaCl 5%	+	+	+	+	+	+
NaCl 6,5 %	+	+	+	+	+	+
NaCl 10 %	+	+	+	+	+	+
NaCl 18 %	+	+	+	+	+	+

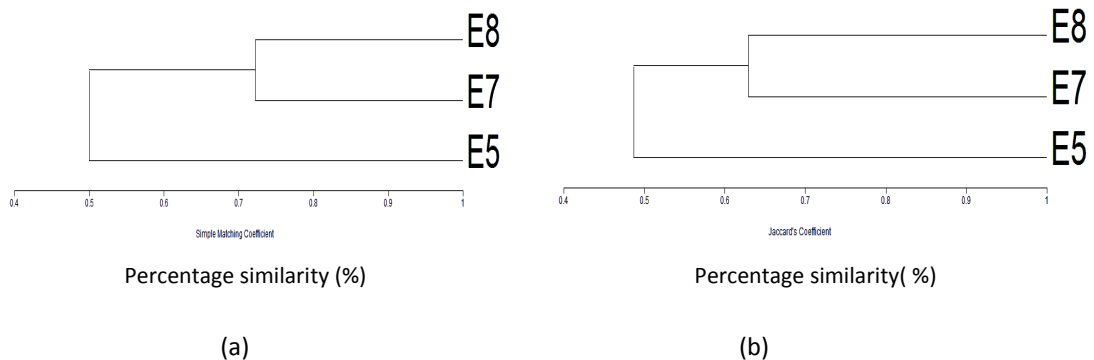
Pada tabel 4 tampak bahwa E₅ dan E₇ memiliki nilai similaritas 55,6%, sedangkan untuk E₅ dan E₈ memiliki nilai similaritas sebesar 44,4% serta pada E₇ dan E₈ menunjukkan nilai similaritas sebesar 72,2%. Nilai similaritas tersebut kemudian dibuat kontruksi dendogram menggunakan algoritma *Average Linkage* (UPGMA) pada Gambar 1 (a). Isolat E₈ dan E₇ memiliki nilai similaritas sebesar 72,2%. Ketiga isolat bergabung di similaritas 50%. Nilai similaritas

Jaccard Coefficient (S_j) dan kontruksi dendogram menunjukkan bahwa nilai isolat E₇ dan E₈ bergabung dengan di similaritas 63%, dan ketiga isolat bergabung pada nilai similaritas 48%. Berdasarkan nilai similaritas tersebut kemudian dibuat kontruksi dendogram menggunakan alogaritma *Average Linkage* (UPGMA). Dendogram yang ditunjukkan pada Gambar 1(b) menunjukkan bahwa isolat E₇ dan E₈ memiliki similaritas yang lebih dekat dibandingkan dengan E₅ yaitu 65%.

Tabel 4. Matriks Similaritas (Ssm) dan *Jaccard Coefficient* (Jc) Antar Isolat Bakteri Endofit dari Daun Binahong Berdasarkan Uji Fenotipiknya terhadap 36 Karakter

Isolat	Ssm			Jc		
	E ₅	E ₇	E ₈	E ₅	E ₇	E ₈
E5	100			100		
E7	55,6	100		52,9	100	
E8	44,4	72,2	100	44,4	63	100





Gambar 1. Dendrogram Hubungan Antara Spesies Isolat Bakteri Endofit Terpilih Berdasarkan Indeks Similaritas Menggunakan Cara (a) S_{SM} dan (b) S_J

Berdasarkan konsep taksospecies, strain mikroba dikelompokkan menjadi satu spesies apabila memiliki indeks similaritas $\geq 70\%$. Isolat E_7 dan E_8 diduga merupakan 1 spesies yang sama dengan perhitungan indeks similaritas menggunakan metode *Simple Matching* 72,2%. sementara berdasarkan perhitungan indeks similaritas menggunakan metode *Jaccard's* indeks similaritas E_7 dan E_8 sebesar 63% sehingga bukan 1 spesies yang sama. Perbedaan nilai similaritas tersebut disebabkan perbedaan nilai indeks similaritas kedua metode tersebut didasarkan pada penggunaan karakter negatif (-) pada perhitungan *Simple Matching*akan tetapi pada perhitungan *Jaccard's Coefficient* karakter double negatif ditiadakan.

Isolat bakteri endofit yang berpotensi sebagai penghasil antimikrobia selanjutnya diidentifikasi berdasarkan karakter fenotipiknya dengan metode *Profile Matching* dengan menggunakan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ketiga isolat tersebut memiliki karakter pembeda diantaranya yaitu isolat E_5 tergolong pada genus *Staphylococcus* karena memiliki bentuk sel kokus dan susunan sel tunggal. Isolat E_7 tergolong *Pseudomonas* karena bersifat Gram negatif dan termasuk bakteri aerob, serta isolat E_8 tergolong *Bacillus* karena memiliki endospora.

Tabel 5. Identifikasi Tingkat Genus (*Generic Assigment*) Isolat Terpilih dengan Metode *Profile Matching*

Karakter Kunci	<i>Staphylococcus</i>	E_5	<i>Pseudomonas</i>	E_7	<i>Bacillus</i>	E_8
Susunan Sel	Tunggal	Tunggal	tunggal/ berpasangan	berpasangan	tunggal/ber pasangan	berpasangan
Bentuk sel	Coccus	Coccus	Basil	basil	Basil	basil pendek
Sifat Gram	+	+	-	-	+	+
Motilitas	NA	NA	Motil	+	Motil	+
Endospora	-	-	NA	NA	+	+
Katalase	+	+	NA	NA	NA	NA
Oksidase	-	-	NA	NA	+	+
Hidrolisis Pati	NA	NA	-	-	NA	NA
Hidrolisis Sitrat	NA	NA	+	+	+/-	-
Kebutuhan O ₂	Fakultatif anaerob	fakultatif anaerob	Aerob	Aerob	aerob/fakultatif anaerob	fakultatif anaerob
Pertumbuhan pada suhu 50°C	NA	NA	NA	NA	+/-	+

NA(Not Applicable)



SIMPULAN, SARAN, DAN REKOMENDASI

Isolat endofit unggul E₅, E₇ dan E₈ yang menunjukkan efek hambatan tinggi terhadap bakteri uji diidentifikasi sebagai anggota *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*. Selanjutnya, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang dihasilkan sebagai antibakteri dari bakteri endofit yang telah diperoleh.

DAFTAR PUSTAKA

- Hallaman, J. and G. Berg. (2006). Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. Dalam: Schulz B, C. Boyle, and T. Sieber (Eds.). Soil biology Microbial root endophytes, Vol. 9. Berlin, Heidelberg, Germany, Springer-Verlag
- Holt JG., Krieg NR., Sneath PHA., Staley JT., Williams ST. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed ke-9. Maryland USA, Williams&Wilkins.
- Pandiangan, Maruba. (2009). Stabilitas Antimikrobia Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthoriza Roxb*) Terhadap Mikroba Patogen. Medika Unika, 4 : p. 365-373
- Priest, F. & B. Austin. (1993). Modern Bacterial Taxonomy. 2nd Edition. London : Chapman & Hall
- Prihatiningtiyas, W. & M.S.H. Wahyuningsih. (2011). Prospek Mikroba Endofit Sebagai Sumber Senyawa Bioaktif .Artikel. <http://mot.farmasi.ugm.ac.id/artikel-55-prospek-mikroba-endofit-sebagaisumber-senyawa-bioaktif.html>
- Strobel, G. & B. Daisy. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Product. Microbiology and Molecular Biology Review, 67: p.491-502
- Zinniel, D.K., P. Lambrech, N.B. Harris, Z. Feng, D. Kuczarski, P. Higley, C.A. Ishimaru, A. Arunakumari, R.G. Barletta & A.K. Vidaver. (2002). Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. Applied and Environmental Microbiology, 68 ; p. 2198-220

TANYA JAWAB

Penanya : Utami Sri Hastuti

Pertanyaan :

- Metode paper disc diffusion bagaimana caranya?
- Morfologi koloni yang mengacu pada ukuran, bagaimana cara mengetahui bentuknya?

Jawab :

- Cara kerja uji antibakteri dengan menggunakan paper disc diffusion yaitu dengan menggunakan kertas cakram yang dicelupkan kedalam cairan supernatant yang dikeringanginkan kemudian ditanam di media NA (Nutrien Agar) dan diinkubasi selama 24-48 jam dengan suhu 27 °C.
- Morfologi koloni yang berkaitan dengan ukuran berpacu pada gambar colony bakteri.

Saran : Pada saat melakukan metode paper disc diffusion diukur konsentrasi cairan supernatannya.

