

ISOLASI MIKROBA ENDOFITIK DARI TUMBUHAN *Quisqualis indica* L. DAN UJI POTENSINYA DALAM MENGHASILKAN SENYAWA ANTIMIKROBA

Priyo Wahyudi¹⁾ & Mochamad Hendriana²⁾

¹⁾ Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi

²⁾ FMIPA Jurusan Farmasi UHAMKA – Jakarta

Abstract

Endophytic microbe is a definition which is given to all microorganisms that during a more or less long period of their life, colonize symptomlessly the living tissues of their hosts. The endophytes can produce useful substances such as oligosaccharide degrading enzyme, antimicrobial substances and plant growth regulator. Quisqualis indica is one of tropical herb that is widely known for traditional medicine. There is no information about endophytic microbes of this plant. The aim of this study are to isolate the endophytic microbes from Q. indica, and screen on their ability in producing antimicrobial substances. Isolation is conducted by direct seed plating method using PDA and NA medium. Liquid fermentation method is taken place using supernatant F4 and PDY medium, then followed by bioassay of the supernatant on three test microbes: Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans. Result of isolation is 25 bacterial isolates and 12 fungal isolates. Result of bioassay showed that there are some isolates that have ability in producing antimicrobial substances. There are 1 bacterial isolate and 2 fungal isolates that showed wide spectrum activity of antimicrobial substance.

Keywords: *endophytic microbe, antimicrobial substance, isolation, screen.*

Pendahuluan

Indonesia merupakan negara beriklim tropis yang memiliki kekayaan dan keanekaragaman hayati tinggi. dikenal sebagai negara mega-biodiversitas. Keanekaragaman hayati tinggi tersebut meliputi keanekaragaman di tingkat ekosistem, spesies dan gen. Salah satu keanekaragaman tumbuhan kita adalah tumbuhan Ceguk (*Quisqualis indica* L.). Tumbuhan ini merupakan perdu merambat, tumbuh di dataran rendah, banyak dijumpai sebagai semak belukar (1).

Ceguk selama ini dikenal masyarakat sebagai salah satu tumbuhan obat karena khasiatnya untuk pengobatan cacingan, gangguan pencernaan (perut kembung), radang ginjal dan penyakit infeksi disentri. Bagian tumbuhan yang dimanfaatkan untuk

pengobatan tradisional tersebut adalah akar, daun, biji dan buahnya (2,3).

Dibidang mikrobiologi, adanya isolat-isolat mikroba baru dari sumber yang ada di alam sangat menarik sebagai sumber genetik baru untuk aplikasi dan rekayasa bioteknologi. Salah satu jenis mikroba yang masih jarang diteliti adalah mikroba endofitik. Mikroba endofitik adalah mikroba yang sebagian atau seluruh hidupnya berada dalam jaringan tumbuhan hidup, tanpa memberikan gejala yang merugikan (4). Mikroba endofitik hidup secara internal di dalam jaringan hidup inangnya secara simbiosis. Tumbuhan memberikan nutrisi pada mikroba endofitik, sementara mikroba endofitik mentransformasikan unsur hara.

Sejauh ini studi yang dilakukan terhadap mikroba endofitik memberikan peluang

dihasilkannya metabolit yang bermanfaat seperti enzim pendegradasi lignin & selulosa, senyawa pengatur tumbuh dan senyawa antimikroba (5). (6) melaporkan bahwa mikroba endofitik dapat diisolasi dari semua jaringan tumbuhan.

Keberadaan mikroba endofitik di dalam jaringan tumbuhan memerlukan adaptasi terhadap mikroekologi dan kondisi fisiologis yang spesifik dari tumbuhan inang.

Seperti halnya tumbuhan Ceguk dan mikroba endofitik, keduanya mempunyai kaitan dalam penentuan masalah pada penelitian ini. Kalau sejauh ini telah banyak diteliti mengenai potensi pemanfaatan metabolit tumbuhan Ceguk untuk aplikasi fitofarmaka, namun penelitian mengenai mikroba endofitik dari tumbuhan ini serta kajian potensinya belum diketahui. Oleh karena itu tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi mikroba endofitik dari tumbuhan Ceguk, dan menguji potensinya dalam menghasilkan senyawa antimikroba.

Bahan dan Metode

Bahan

Sampel ranting tumbuhan Ceguk (*Q. indica*) diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) Departemen Pertanian – Bogor. Medium isolasi mikroba endofitik adalah PDA (Potato Dextrose Agar) dan NA (Nutrien Agar). Medium fermentasi senyawa antimikroba adalah F4 dan PDY (Potato Dextrose Yeast extract). Mikroba untuk bioassay digunakan *Staphylococcus aureus* BPPT CC 0014, *Escherichia coli* BPPT CC 0013, dan *Candida albicans* BPPT CC 4001. Bahan lain yang digunakan adalah larutan sodium hipoklorit 5,3%, etanol 76%, pewarna Gram, dan kertas cakram (ADVANTEC) diameter 8 mm.

Isolasi mikroba endofitik

Sampel berupa ranting tumbuhan Ceguk terlebih dahulu dibersihkan dengan air mengalir selama 10 menit, kemudian ditiriskan. Setelah ditiriskan, ranting dipotong melintang menjadi potongan kecil berukuran 1 – 2 cm. Potongan ranting tersebut kemudian disterilisasi permukaan, mengikuti (4), dilakukan secara bertingkat dengan mencelupkan ke dalam etanol 75% selama 1 menit, kemudian selama 5 menit dicelupkan pada larutan sodium hipoklorit 5,3% dan terakhir dibilas dengan etanol 75% selama 30 detik. Prosedur sterilisasi permukaan yang dilakukan sudah cukup untuk menghambat pertumbuhan mikroba permukaan batang (7). Potongan ranting yang telah disterilisasi, kemudian dibelah menggunakan scalpel dan segera ditempatkan (*direct seed plating*) di atas permukaan medium isolasi (PDA dan NA), dengan posisi permukaan belahan menempel pada agar medium. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 5 – 7 hari.

Mikroba yang tumbuh pada medium isolasi dipisahkan berdasarkan kelompok bakteri dan kapang. Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium NA dan kapang pada medium PDA. Pemurnian dilakukan dengan membuat kultur cawan beberapa tahap sampai diperoleh isolat tunggal yang kemudian dikultur pada agar miring. Pengamatan morfologi yang dilakukan terhadap isolat bakteri adalah bentuk, warna koloni dan bentuk sel serta pewarnaan Gram. Pengamatan morfologi terhadap isolat kapang adalah bentuk dan warna koloni.

Fermentasi produksi senyawa antimikroba

Fermentasi cair dilakukan dengan dua medium yaitu F4 dan PDY. Medium F4 untuk isolat bakteri, sedangkan PDY untuk isolat kapang. Medium F4 mempunyai komposisi: 40 g gliserol, 25 g Soybean meal (SBM), 5 g ekstrak yeast, 1 g Corn Steep Liquor (CSL), 0,5 g NaCl, dan 2 g CaCO₃ dalam 1000 ml

akuades, dengan pH dibuat 7,0. Medium PDY mempunyai komposisi: 24 g Potato Dextrose Broth, 2 g ekstrak yeast, 5 g CaCO₃ dalam 1000 ml akuades, dengan pH dibuat 6,0. Inkubasi dilakukan dengan kecepatan goyangan 130 rpm, pada suhu kamar selama 2 hari (untuk isolat bakteri) dan 4 hari (untuk isolat kapang).

Setelah waktu inkubasi berakhir, dilakukan pemisahan massa sel dengan cairan medium dengan jalan disentrifus pada kecepatan 6.000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan, selanjutnya dipakai sebagai larutan kasar antimikroba pada bioassay.

Pemeriksaan Biologis

Bioassay dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa antimikroba dalam supernatan hasil fermentasi isolat mikroba endofitik pada medium F4 dan PDY. Metode difusi agar dilakukan pada bioassay dengan menggunakan kertas cakram (ADVANTEC) berdiameter 8 mm. Kertas cakram dicelupkan kedalam supernatan kemudian dikering anginkan. Kemudian dilakukan pencelupan yang kedua kali, dan dikering anginkan kembali. Setelah kering, kertas-kertas cakram ditempatkan di atas medium bioassay yang masing-masing telah diinokulasi dengan mikroba uji *S. aureus*, *E. coli* dan *C. albicans*. Inkubasi bioassay dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan terhadap munculnya zona bening di sekitar kertas cakram, sebagai hasil positif.

Hasil dan Pembahasan

Hasil

Isolasi mikroba endofitik dari ranting tumbuhan Ceguk diperoleh sebanyak 25 isolat bakteri dan 12 isolat kapang (Tabel 1 dan Tabel 2). Dari 25 isolat bakteri, sebanyak 19 isolat merupakan bakteri Gram positif dan 6 isolat merupakan Gram negatif.

Isolat bakteri endofitik yang diperoleh sebagian besar berbentuk bulat (75%) dan batang pendek (25%). Sebagian besar isolat kapang endofitik adalah hifa bersepta, warna koloni putih, dan tidak membentuk konidia. Diperolehnya isolat-isolat mikroba dari ranting tumbuhan Ceguk memberi gambaran bahwa tanaman tersebut mengandung mikroba endofitik dengan tingkat keragaman jenis yang cukup tinggi.

Bioassay yang dilakukan terhadap supernatan dengan metode difusi agar diketahui bahwa dari 25 isolat bakteri endofitik menunjukkan kemampuan aktivitas antimikroba yang berbeda-beda. Enam isolat mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *E. coli*, 6 isolat menghambat *S. aureus* dan 14 isolat menghambat *C. albicans*. Namun, supernatan beberapa isolat bakteri ada yang menunjukkan aktivitas antimikroba yang lebih luas yaitu 3 isolat mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *E. coli* dan *C. albicans*, 1 isolat menghambat *E. coli* dan *S. aureus*, dan 2 isolat menghambat *S. aureus* dan *C. albicans*. Satu isolat menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap ketiga mikroba uji sekaligus yaitu isolat Nb 4.1 (Tabel 1).

Hasil bioassay supernatan dari 12 isolat kapang endofitik menunjukkan fenomena yang sama, yaitu aktivitas antimikroba yang berbeda-beda. Sebanyak 4 isolat dapat menghambat *E. coli*, 6 isolat mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *S. aureus* dan 11 isolat menghambat *C. albicans*. Supernatan beberapa isolat kapang endofitik juga mempunyai kemampuan menghambat dua mikroba uji sekaligus, yaitu sebanyak 2 isolat menghambat *E. coli* dan *C. albicans*, 3 isolat menghambat *S. aureus* dan *C. albicans*. Bahkan terdapat 2 isolat yang menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap ketiga mikroba uji yaitu isolat Pk 4.2 dan Nk 6.1 (Tabel 2). Supernatan yang memberikan hasil positif pada bioassay ini kemungkinan tidak hanya mengandung senyawa

aktif tunggal, melainkan lebih dari satu. Hal tersebut ditandai dengan kemampuan penghambatan yang berspektrum luas.

Hasil positif dari bioassay menunjukkan bahwa isolat-isolat mikroba endofitik dari tumbuhan Ceguk mampu memproduksi senyawa antimikroba. Aktivitas penghambatan pertumbuhan terhadap satu mikroba uji saja menunjukkan kemampuan aktivitas antimikroba yang berspektrum sempit (*narrow spektrum*). Sementara supernatan yang menunjukkan kemampuan dalam menghambat pertumbuhan lebih dari satu mikroba uji (Gram positif, Gram negatif dan yeast) menunjukkan kemampuan aktivitas antimikroba yang berspektrum luas (*wide spectrum*).

Senyawa antimikroba yang terkandung dalam supernatan bercampur dengan air sisa medium fermentasi sehingga disebut sebagai larutan kasar senyawa antimikroba. Pada penelitian ini belum dilakukan isolasi senyawa aktif antimikroba karena penelitian ini merupakan kajian awal untuk mengetahui dapat tidaknya isolat-isolat mikroba memproduksi senyawa antimikroba. Penelitian bidang kimia untuk mengekstraksi atau mengisolasi senyawa aktif antimikroba dapat dilakukan terhadap supernatan-supernatan yang memberikan hasil positif pada bioassay pada penelitian ini.

Dapat diisolasinya mikroba endofitik dari tumbuhan Ceguk dan kemampuan isolat-isolat tersebut memproduksi senyawa antimikroba memberikan gambaran bahwa ternyata selain tumbuhan Ceguk yang mempunyai banyak manfaat, mikroba endofitik yang terkandung di dalamnya pun mempunyai potensi sebagai penghasil senyawa antimikroba. Pengembangan lebih lanjut terhadap isolat yang berpotensi tinggi adalah dengan melakukan optimasi terhadap faktor-faktor yang mempengaruhi proses fermentasi untuk produksi antimikroba. Pemilihan medium, suhu, pH dan waktu inkubasi yang optimum menjadi kajian yang akan mendasari aplikasi isolat endofitik berpotensi di industri farmasi.

Kesimpulan

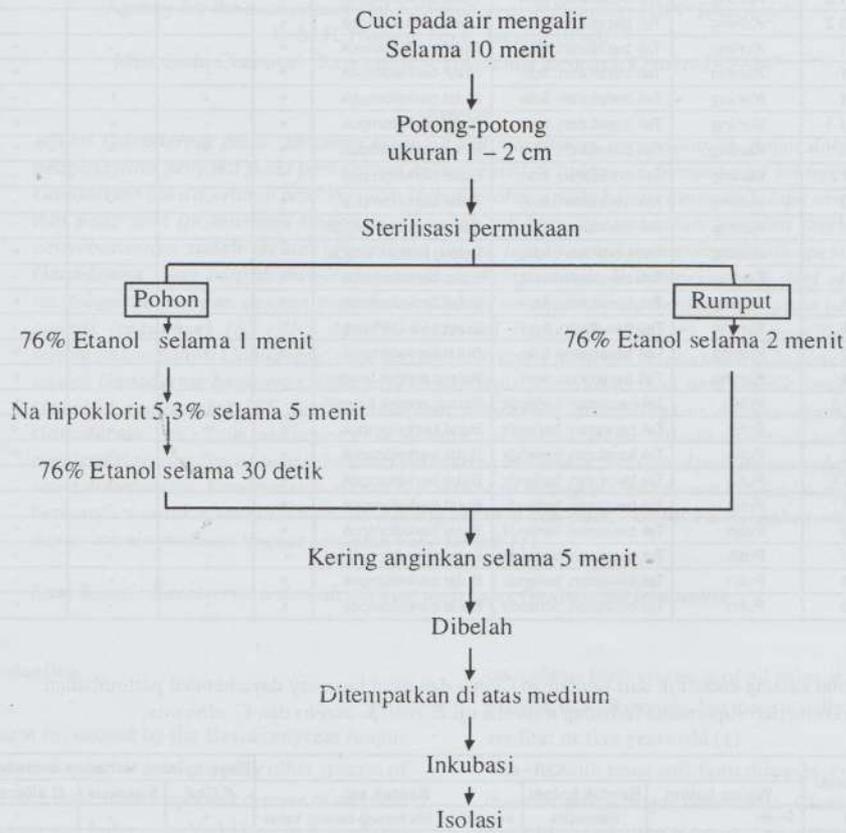
1. Mikroba endofitik dapat diisolasi dari ranting tumbuhan Ceguk (*Q. indica*) yang terdiri dari 25 isolat bakteri dan 12 isolat kapang endofitik.
2. Terdapat 1 isolat bakteri endofitik yang mempunyai aktivitas antimikroba berspektrum luas yaitu Nb 4.1.
3. Terdapat 2 isolat kapang endofitik yang mempunyai aktivitas antimikroba berspektrum luas yaitu Pk 4.2 dan Nk 6.1.

Saran

Disarankan untuk meneliti lebih lanjut mengenai optimasi proses fermentasi antimikroba terhadap isolat-isolat berpotensi tinggi. Serta melakukan ekstraksi dan isolasi senyawa aktif antimikroba dari hasil fermentasi tersebut.

Daftar Pustaka

1. Heyne, K. 1987. Tanaman Berguna Indonesia. Jilid III. Cetakan ketiga. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan. Jakarta.
2. Wijayakusuma, H., S. Dalimarta & A.S. Wirian. 1991. Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia. Jilid III. Pustaka Kartini, Jakarta
3. Dalimarta, S. 1999. Ramuan Tradisional untuk Pengobatan Kanker. PT Penebar Swadaya. Jakarta.
4. Petrini, O., T.N. Sieber, L. Toti & O. Viret. 1992. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat. Toxins*. **1**: 185 - 196.
5. Wahyudi, P. 1997a. Teknik Skrining Mikroba Endofitik Penghasil Antibiotika Baru. Laporan Teknis Intern BPPT. Jakarta
6. Wahyudi, P. 1997b. Mikroba Endofitik sebagai Penghasil Materi yang Bermanfaat. Laporan Teknis Intern BPPT. Jakarta.
7. Bacon, C.W. 1988. Procedur for isolating the endophytic from tall fescue and screening isolates for ergot alkaloids. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2615 - 2618.



Gambar 1. Skema isolasi mikroba endofitik dari sampel tumbuhan

Tabel 1. Isolat bakteri endofitik dari tumbuhan Ceguk dan hasil bioassay daya hambat pertumbuhan mikroba dari supernatan terhadap mikroba uji *E. coli*, *S. aureus* dan *C. albicans*

No	Kode isolat	Ciri - ciri				Daya hambat terhadap mikroba uji		
		Warna koloni	Bentuk koloni	Bentuk sel	Gram	<i>E.Coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
1	Nb 1.1.2	Kuning	Tak beraturan, licin	Bulat berkelompok	+	-	-	+
2	Nb 1.3.2	Kuning	Tak beraturan, licin	Bulat berkelompok	+	-	-	-
3	Pb 9.1	Kuning	Tak beraturan, licin	Bulat berkelompok	+	-	-	+
4	Pb 7.1	Kuning	Tak beraturan, licin	Bulat berkelompok	+	-	-	+
5	Pb 1.4	Kuning	Tak beraturan, licin	Bulat berkelompok	+	+	+	-
6	Nb 1.4.1	Kuning	Tak beraturan, licin	Bulat berkelompok	+	-	+	+
7	Nb 1.2	Kuning	Tak beraturan, licin	Bulat berkelompok	+	+	-	+
8	Nb 10.2	Kuning	Tak beraturan, licin	Bulat berkelompok	+	-	-	-
9	Nb 4.3	Kuning	Tak beraturan, licin	Bulat berkelompok	+	-	-	-
10	Pb 1.1	Kuning	Tak beraturan, licin	Batang pendek tunggal	-	-	+	-
11	Nb 3.3	Kuning	Tak beraturan, licin	Batang pendek tunggal	-	-	-	+
12	Nb 6.3	Kuning	Tak beraturan, licin	Bulat berkelompok	+	-	+	-
13	Nb 4.1	Kuning	Tak beraturan, licin	Bulat berkelompok	+	+	+	+
14	Nb 4.4.1	Kuning	Tak beraturan, licin	Bulat berkelompok	+	-	-	-
15	Nb 3.2	Kuning	Tak beraturan, licin	Bulat berkelompok	+	+	-	+
16	Pb 4.4	Kuning	Tak beraturan, licin	Batang pendek tunggal	-	-	-	+
17	Nb 10.3	Putih	Tak beraturan, berlendir	Batang pendek tunggal	-	-	-	+
18	Nb 5.3	Putih	Tak beraturan, berlendir	Bulat berkelompok	-	+	-	-
19	Nb 8.3	Putih	Tak beraturan, berlendir	Bulat berkelompok	+	-	+	+
20	Nb 10.4	Putih	Tak beraturan, berlendir	Bulat berkelompok	+	-	-	-
21	Nb 5.1	Putih	Tak beraturan, berlendir	Bulat berkelompok	+	-	-	-
22	Nb 8.2	Putih	Tak beraturan, berlendir	Bulat berkelompok	+	-	-	+
23	Nb 3.1	Putih	Tak beraturan, berlendir	Batang pendek tunggal	-	-	-	-
24	Pb 1.3	Putih	Tak beraturan, berlendir	Bulat berkelompok	+	-	-	+
25	Nb 7.3	Putih	Tak beraturan, berlendir	Bulat berkelompok	+	+	-	+

Tabel 2. Isolat kapang endofitik dari tumbuhan Ceguk dan hasil bioassay daya hambat pertumbuhan mikroba dari supernatan terhadap mikroba uji *E. coli*, *S. aureus* dan *C. albicans*

No	Kode isolat	Ciri - ciri			Daya hambat terhadap mikroba uji		
		Warna koloni	Bentuk koloni	Bentuk sel	<i>E.Coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
1	Nk 7.1	Putih	Bersepta	Koloni bulat, hifa benang-benang, kapas	+	-	+
2	Nk 8.4	Putih	Bersepta	Koloni bulat, hifa benang-benang, kapas	-	+	+
3	Pk 7.2	Putih	Bersepta	Koloni bulat, hifa benang-benang, kapas	-	-	+
4	Nk 2.3	Putih	Bersepta	Koloni bulat, hifa benang-benang, kapas	+	-	+
5	Pk 8.4	Putih	Bersepta	Koloni bulat, hifa benang-benang, kapas	-	-	+
6	Nk 6.1	Putih agak orange	Bersepta	Koloni bulat, hifa benang-benang, kapas	+	+	+
7	Pk 6.3	Putih kekuningan	Bersepta	Koloni bulat, hifa benang-benang, kapas	-	-	+
8	Pk 4.2	Putih	Bersepta	Koloni bulat, hifa benang-benang, kapas	+	+	+
9	Pk 6.2	Putih keunguan	Bersepta	Koloni bulat, hifa benang-benang, kapas	-	-	+
10	Pk 4.1	Putih	Bersepta	Koloni bulat, hifa benang-benang, kapas	-	+	-
11	Pk 8.1	Putih	Bersepta	Koloni bulat, hifa benang-benang, kapas	-	+	+
12	Pk 10.1.1	Putih kekuningan	Bersepta	Koloni bulat, hifa benang-benang, kapas	-	+	+