

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT DARI RIMPANG TEMULAWAK (*Curcuma xanthorrhiza*) SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis*

Rohana Imawati (NIM. 10620013)

Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

rohanaimawati1992@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis bakteri endofit yang terdapat di rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) serta kemampuan senyawa bioaktif yang dihasilkan mikroba endofit hasil isolasi sebagai senyawa antimikroba. Penelitian dilakukan dengan cara mengisolasi bakteri endofit dari rimpang temulawak yang diperoleh dari Batu dan Purwodadi yang kemudian dilakukan identifikasi terhadap bakteri endofit yang tumbuh pada media NA. Produksi metabolit sekunder bakteri didapat dari fermentasi dan diuji aktifitasnya terhadap bakteri *P. aeruginosa* dan *S. epidermidis* dengan menggunakan metode difusi agar (Kirby-Bauer).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebanyak 4 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari rimpang temulawak, yaitu spesies *Actinomyces viscosus* dan *Pseudomonas stutzeri* dari Batu, *Actinomyces viscosus* dan *Bacillus brevis* dari Purwodadi. Zona hambat terhadap bakteri uji *P. aeruginosa* didapat 3,3 mm untuk *Actinomyces viscosus* dari Batu, 5,6 mm untuk *Pseudomonas stutzeri*, 5 mm untuk *Actinomyces viscosus* dari Purwodadi dan 4 mm untuk *Bacillus brevis*. Zona hambat terhadap bakteri uji *S. epidermidis* didapat 3,7 mm untuk *Actinomyces viscosus* dari Batu, 3,3 mm untuk *Pseudomonas stutzeri*, 1,7 mm untuk *Actinomyces viscosus* dari Purwodadi dan 4,7 mm untuk *Bacillus brevis*.

Kata Kunci: bakteri endofit, rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*

PENDAHULUAN

Tanaman merupakan salah satu sumber daya yang sangat penting dalam mempertahankan kesehatan masyarakat. Badan Kesehatan Dunia (WHO), 80% penduduk dunia masih menggantungkan pada pengobatan tradisional, termasuk penggunaan obat yang berasal dari tanaman. Seperempat dari obat modern yang beredar di dunia berasal dari bahan aktif yang diisolasi dan dikembangkan dari tanaman (Radji, 2005).

Mikroba endofit merupakan mikroorganisme yang tumbuh dalam jaringan tumbuhan dan dapat dijumpai pada bagian akar, daun serta batang tumbuhan. Mikroba endofit dapat menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang dapat berperan sebagai antimikrobia, anti malaria, antikanker dan juga dapat digunakan dalam dunia pertanian dan industri. Mikroba endofit memiliki prospek yang baik dalam penemuan sumber-sumber senyawa bioaktif yang dalam perkembangan lebih lanjut dapat dijadikan sebagai sumber penemuan obat untuk berbagai macam penyakit (Prihatiningtias, 2005).

Selain mikroba endofit mudah untuk ditumbuhkan dan memiliki siklus hidup yang pendek, salah satu sumber senyawa bioaktif mikroba endofit

ini dapat dimanfaatkan sebagai obat. Strobel (2000) beberapa mikroba endofit dapat menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif sebagai senyawa metabolit sekunder yang memiliki daya antimikroba, antimalaria, antikanker dan sebagainya.

Tan (2001) dalam Radji (2005) menjelaskan bahwasannya tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang menghasilkan metabolit sekunder. Bakteri endofit dapat membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya.

Penyakit luka bakar, endocarditis dan nanah kebiruan diakibatkan oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Nikham (2006) Bakteri *P. aeruginosa* gram negative berbentuk batang. Distribusinya luas di seluruh dunia, habitat umumnya tanah. Penyebab infeksi luka sehingga menimbulkan nanah hijau-biru dan menyebabkan infeksi saluran kencing, endocarditis setelah operasi jantung, diare meningitis, infeksi mata dan septimia. Imunitas yang rendah seperti penderita AIDS, pasien kritis dan pengguna obat terlarang sangat mudah terserang oleh bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Bakteri *Staphylococcus epidermidis* merupakan bakteri yang menyebabkan pernanahan tapi lebih bersifat parasit daripada patogen. Namun infeksi yang terjadi menyebabkan subakut endocarditis penyebab dari infeksi hati dan

penyebab dari infeksi hati dan kardiovaskuler, membrane perifer vaskuler, pembuluh intravena dan saluran kemih.

Penelitian uji antimikroba *Curcuma* spp. terhadap pertumbuhan *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang dilakukan oleh Adila (2013) menjelaskan bahwa berdasarkan katagori daya hambat, temulawak lebih sensitif dalam menghambat pertumbuhan ketiga mikroba uji dibandingkan dengan *Curcuma* lain terutama pada bakteri *Escherichia.coli*.

Nur (2006) menyatakan temulawak sangat sensitif terhadap ketiga mikroba uji. Diduga ekstrak segar rimpang temulawak memiliki senyawa antimikroba yang khas yaitu *xanthorrhizol* yang tidak dimiliki oleh rimpang *Curcuma* lainnya walaupun hanya dalam jumlah yang sangat kecil. Hansel (1980) senyawa *xanthorrhizol* pada temulawak 6 % sedangkan pada kunyit 3 %. Senyawa *xanthorrhizol* merupakan senyawa aktif antimikroba utama yang terdapat dalam rimpang temulawak.

Penelitian tentang mikroba endofit khususnya bakteri endofit dari rimpang temulawak belum banyak dilakukan, oleh karena itu diperlukan penelitian tentang isolasi dan identifikasi bakteri endofit yang mempunyai kemampuan penghasil senyawa antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis*. Antimikroba hasil penelitian ini diharapkan sangat membantu pasien yang terserang penyakit dari bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi dan eksperimen. Eksplorasi dan eksperimen dengan cara mengisolasi dan identifikasi mikroba endofit dari rimpang tanaman Temulawak (*Curcuma xanthorrhizha*) yang diambil dari kebun warga di daerah Batu dan Purwodadi, kemudian diuji isolat mikroba endofit terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis* yang mempunyai kemampuan menghasilkan senyawa aktif sebagai antibakteri.

Alat Penelitian

Alat alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laminar air flow cabinet, autoklaf, cawan petri, jarum ose, bunsen, kompor listrik, pengaduk kaca, pinset, kertas saring, inkubator, aluminium foil, mikroskop, cover glass, gelas obyek, gelas ukur, tabung reaksi, botol media, erlenmeyer, jangka sorong, shaker inkubator, sentrifugasi, timbangan analitik dan pisau.

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian diantaranya Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhizha*) dan biakan murni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan bakteri *Staphylococcus epidermidis*, media Nutrient Agar (NA), media Nutrient Broth (NB), media Muller-Hinton Broth (MHB), media Muller-Hinton Agar (MHA), aquades, alcohol 70%, etanol 75% dan sodium hipoklorit (NaOCl) 5,3%, larutan antifungi, kertas saring Whatman 0,22 µm, kertas cakram, pewarnaan gram (larutan gentian violet, larutan iodium, larutan safranin, alkohol 96%, mikrobact, kapas, spirtus, tisu.

Proses Isolasi Bakteri Endofit

Rimpang temulawak di cuci air mengalir selama 3 menit, di kupas bagian luarnya. Dipotong dan ditimbang sebanyak 1 gram. Sampel direndam di larutan etanol 75% sebanyak 10 ml selama 3 menit, direndam larutan sodium hipoklorit (NaOCl) 5,3% sebanyak 10 ml selama 3 menit, di rendam larutan etanol 75% sebanyak 10 ml selama 3 menit, direndam di larutan antifungi sebanyak 10 ml selama 1 menit dibilas aquades selanjutnya dimasukkan cawan petri steril. Sampel tersebut dimasukkan ke dalam media nutrient agar sebagai kontrol penelitian. Sampel yang lainnya dipotong longitudinal didalam cawan petri dalam keadaan steril. Bagian dalam potongan tersebut dimasukkan ke dalam cawan petri berisi media nutrient agar kemudian diinkubasi selama 24-48 jam Pada suhu 35°C (Strobel, 2000).

Pemurnian Bakteri Endofit

Koloni yang memiliki bentuk dan warna yang sama dianggap sebagai isolat yang sama. Setiap koloni kemudian dipindahkan ke medium nutrient agar dengan cara menggoreskan koloni tunggal mikroba dengan metode *streak kuadran* dan diinkubasi selama 24 jam.

Identifikasi Bakteri Endofit

Bakteri murni yang telah diisolasi kemudian dikarakterisasi dan diidentifikasi yang dilakukan secara biokimia yang mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (2005), karakterisasi yang dilakukan meliputi :

1. Pengamatan makroskopik

Karakteristik koloni bakteri hasil isolasi yaitu berdasarkan (Bergey's, 2005):

- Bentuk koloni (dilihat dari atas) : berupa titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar, serupa kumparan.
- Permukaan koloni (dilihat dari samping) : rata, timbul-datar, melengkung, membukit, serupa kawah.

- c. Tepi koloni (dilihat dari atas) : utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.
- d. Warna koloni : keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening.

2. Pengamatan mikroskopik

Berdasarkan warna Gram, dilakukan uji biokimia untuk identifikasi lanjut. Uji dengan Microbact dilakukan terhadap bakteri berbentuk gram negatif yang sebelumnya telah dilakukan tes oksidase memakai oksidase strip (hasil positif memberikan warna biru-ungu). Bakteri gram negatif berbentuk batang dan oksidase positif, diuji dengan Microbact 12E dan 12B, sedangkan yang hasilnya menunjukkan oksidase negative dengan Microbact 12E saja. Satu sengkeli isolate bakteri endofit dimasukkan kedalam 5-10 ml NaCl 0,85% kekeruhan 0,5 McFarland, kemudian suspensi bakteri dimasukkan ke dalam sumuran Microbact dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 16-24 jam. Kemudian hasilnya didapat dengan cara membandingkan dengan warna yang ada dalam tabel dan memasukkan datanya ke komputer yang telah di program dalam file Mikrobact

Pembuatan Inokulum

Pembuatan inokulum ditentukan dengan menggunakan perbandingan kekeruhan Mc Farland 0,5. Inokulum dibuat dengan menambahkan biakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang berumur 24 jam kedalam 3 ml larutan NaCl 0,85% kemudian suspensi dibandingkan dengan kekeruhan larutan Mc Farland 0,5. (Rosenblatt 1980).

Produksi Metabolit Sekunder Bakteri Endofit

Koloni bakteri endofit diambil satu sengkeli dan dipindahkan ke dalam 5 ml medium Muller-Hinton Broth (MHB), kemudian dilarutkan memakai tube-stirrer sampai mencapai kekeruhan 0,5 McFarland. Suspensi bakteri endofit dipindahkan sebanyak 1 ml ke dalam 9 ml medium MHB pada tabung reaksi, diinkubasi pada suhu 30°C menggunakan shaker inkubator 130 rpm selama 16 jam dan 18 jam (fase akhir log tiap spesies). Setelah selesai, masing-masing medium pertumbuhan disentrifugasi dengan kecepatan 2000g (3800 rpm) pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan diambil menggunakan kertas saring Whatman 0,22 µm.

Pembuatan Bakteri Uji

Biakan murni bakteri diremajakan pada media agar padat dengan cara bakteri diambil 1 ose lalu jarum ose yang mengandung bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* digoreskan secara aseptis pada media nutrisi agar pada cawan yaitu dengan mendekatkan cawan pada nyala api saat menggoreskan jarum ose. Kemudian cawan petri ditutup kembali dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam

inkubator, kemudian diambil 1 koloni dan ditanam dalam media nutrient broth sampai mencapai kekeruhan 0,5 McFarland.

Uji Antibakteri

Medium yang digunakan untuk uji aktifitas antibakteri yaitu medium Mueller Hinton Agar. Uji aktifitas antibakteri mikroba endofit terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan dengan metode uji Kirby-Bayer menggunakan kertas cakram. Kertas cakram dibuat dari kertas saring Whatman dengan cara mengguntingnya dengan alat pembolong kertas sehingga didapatkan kertas cakram dengan diameter 7 mm. Simarmata (2007) secara aseptik, kertas cakram yang sudah disterilkan direndam dalam 50 µl supernatan kultur bakteri endofit selama 30 menit. Kertas cakram diambil dengan menggunakan pinset steril dan diletakkan di atas medium uji aktifitas antibakteri (medium plat MHA). Kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan pengamatan terhadap zona jernih yang terbentuk dan diukur diameternya. Sampel yang mempunyai potensi menghasilkan zat antibakteri dengan adanya zona hambat zona jernih.

Sebagai kontrol positif digunakan amoxycilin dan kontrol negatif digunakan cakram kosong steril kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan pengukuran terhadap zona jernih yang terbentuk dan diukur diameternya. Sampel yang mempunyai potensi menghasilkan zat antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona jernih.

Pengukuran zona Hambat

Zona hambat yang terbentuk diamati disekitar isolat yang diuji, karena luasan zona bentuknya maka luas zona hambat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Simarmata, 2007):

$$Lz = Lav - Ld$$

Dimana:

Lz = Luas zona hambat (mm)

Lav = Luas zona hambat dengan kertas saring (mm)

Ld = Luas diameter kertas saring (mm)

Analisis Data

Data yang diperoleh dengan cara mengukur diameter zona hambat yang terbentuk, pengumpulan data dilaksanakan sebagai berikut: mengukur zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat adalah diameter yang tidak ditumbuhi oleh bakteri di sekitar paper disk dikurangi diameter paper disk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan sebagai sumber isolat mikroba endofit berasal dari rimpang temulawak yang diperoleh dari kebun warga di Batu dan Purwodadi. Natrium hipoklorit dan etanol berfungsi sebagai desinfektan yang berguna untuk mensterilkan permukaan dari rimpang temulawak secara kimia. Larutan antifungi berfungsi agar rimpang temulawak yang ditempelkan di media nutrient agar tidak ditumbuhi fungi. Tabel 1 menunjukkan hasil isolasi, dimana 2 isolat berasal dari Batu dan 2 isolat berasal dari Purwodadi.

Tabel 1. Hasil Isolasi Bakteri Endofit dari Temulawak

Daerah Sampel	Jumlah Bakteri	Kode Isolat
Batu	2	BT1
		BT2
Purwodadi	2	PD1
		PD2

Keterangan Tabel 1. BT=Rimpang dari Batu, PD=Rimpang dari Purwodadi

Empat isolat bakteri endofit hasil dari rimpang temulawak selanjutnya diidentifikasi berdasarkan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis sampai dengan tingkat spesies berdasarkan buku kunci identifikasi Bergey's (2005). Hasil identifikasi secara makroskopis ditunjukkan oleh tabel 2.

Tabel 2 Ciri Makroskopis Hasil Isolasi

Keterangan Tabel 2 BT=Rimpang dari Batu, PD=Rimpang dari Purwodadi

Identifikasi Bakteri Endofit Dari Rimpang Temulawak

Pengamatan secara pewarnaan Gram menunjukkan bahwa bentuk isolat mikroba adalah batang. Tabel 4.3 menunjukkan bahwa isolat mikroba endofit didominasi oleh bakteri Gram positif sebanyak 3 dan bakteri Gram negatif sebanyak 1 isolat dari seluruh isolat mikroba endofit. Gram negative ditunjukkan dengan adanya koloni berwarna merah, sedangkan gram positif ditunjukkan dengan koloni berwarna ungu. Bakteri Gram positif mampu mempertahankan zat warna utama dalam pewarnaan Gram, yaitu *Gentian Violet*, sehingga ampak berwarna ungu saat pengamatan dikarenakan dinding sel kelompok bakteri ini tersusun oleh sebagian besar petidoglikan, yang mampu mengikat zat warna dan tidak rusak saat dicuci dengan alkohol. Bakteri Gram negative memiliki komposisi dinding sel yang sebagian besar tersusun dari lapisan lipid, sehingga pada saat pewarnaan kurang dapat mempertahankan zat warna utama terutama saat dicuci dengan alkohol

(lipid rusak saat dicuci dengan alkohol), akibatnya kelompok bakteri ini memberikan penampakan warna merah (warna dari zat warna kedua, safranin) diakhir perlakuan pewarnaan Gram.

Tabel 3. Hasil pengamatan bakteri berdasarkan pewarnaan gram

Kode isolat	Pewarnaan Gram	Bentuk
BT1	Positif	Batang tunggal
BT2	Negatif	Batang tunggal
PD1	Positif	Batang tunggal
PD2	Positif	Batang tunggal

Keterangan Tabel 3. BT=Rimpang dari Batu, PD=Rimpang dari Purwodadi

Dari hasil pewarnaan Gram dapat diketahui adanya gram positif dan gram negatif, kemudian dilakukan uji lanjut untuk mengetahui jenis spesiesnya. Dari 4 koloni bakteri endofit, ditemukan 3 gram positif dan 1 gram negative. Untuk gram negative di uji dengan sumuran Mikrobact 12A sedangkan gram positif di uji dengan konvensional. Dari 4 koloni ditemukan 3 bakteri yang berbeda yang dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil Identifikasi bakteri endofit

Kode Isolat	Nama Spesies
BT1	<i>Actinomyces viscosus</i>
BT2	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
PD1	<i>Actinomyces viscosus</i>
PD	<i>Bacillus brevis</i>

Keterangan Tabel 4. BT=Rimpang dari Batu, PD=Rimpang dari Purwodadi

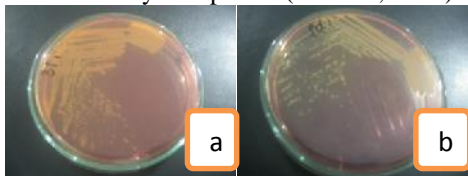
Isolat BT1 dan PD1 (*Actinomyces viscosus*)

Kode Isolat	Bentuk Koloni	Permukaan Koloni	Tepi Koloni	Warna Koloni
BT1	Bulat	Tidak Rata	Utuh	Krem
BT2	Bulat	Rata	Bergerigi	Putih
PD1	Bulat	Tidak Rata	Utuh	Krem
PD2	Bulat	Rata	Utuh	Putih

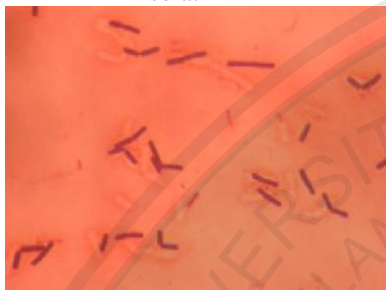
Isolate BT1 dan PD1, bakterinya berbentuk batang, tidak mempunyai spora. Fermentasi karbohidrat yang positif ditunjukkan dalam fermentasi arabinose, fruktosa, glukosa, inositol, maltose, raffinosa, salicin dan sukrosa. Hasil identifikasi menunjukkan isolat BT1 dan PD1 merupakan spesies *Actinomyces viscosus*.

Bakteri *Actinomyces viscosus* tumbuh menyebar, pinggiran tidak rata, permukaan keriput, berwarna putih, gram positif sel umumnya berbentuk batang tunggal (monobacillus), diameter sel 0.5-1 μm , panjang sel 1-3 μm . *Actinomyces* berbentuk batang, tidak bergerak, tidak dapat membentuk endospore, respirasi secara fakultatif anaerob dengan rentang suhu pertumbuhan 35-37°C. Spesies ini dapat

memfermentasikan gula, tidak menghasilkan enzim urease, menghasilkan enzim katalase, H₂S positif, sitrat positif dan methyl red positif (Komala, 2012).



Gambar 1 Isolat Bakteri *Actinomyces viscosus* pada media nutrient agar
a. Isolat BT1, b. Isolat PD1



Gambar 2 Foto mikroskopis bakteri *Actinomyces viscosus* Isolat BT1 (400x)



Gambar 3 Foto mikroskopis bakteri *Actinomyces viscosus* Isolat PD1 (400x)

Isolat BT2 (*Pseudomonas stutzeri*)

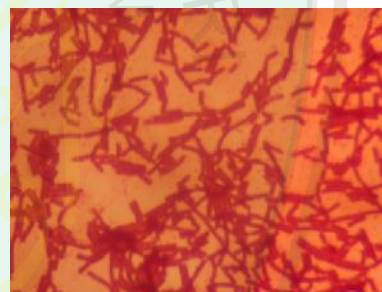
Isolat BT2 menunjukkan adanya bakteri endofit yang selnya berbentuk batang, golongan gram negatif, kemudian di uji dengan microbact GNB 12A diperoleh hasil dapat mereduksi oksidase, dapat bergerak, positif nitrat dan ONPG (Operations Nuclear Planning Group). Hasil dari data base microbact di proses dan diinput dengan program file microbact bakteri dengan ciri-ciri tersebut tergolong dalam genus *Pseudomonas* dan spesies *Pseudomonas stutzeri* 68,70%.

Robert (1989), bakteri *Pseudomonas* merupakan bakteri yang bersifat gram negatif dan berbentuk basil. Bakteri *Pseudomonas* termasuk golongan bakteri mesofil, bakteri tersebut dapat tumbuh optimal pada kisaran 25-35°C dengan suhu optimum 40°C.



Gambar 4. Bakteri *Pseudomonas stutzeri* isolat BT2 pada media nutrient agar

Pseudomonas stutzeri memiliki sel berbentuk lurus atau sedikit berlekuk. Bersifat motil oleh satu atau beberapa flagella. Bersifat aerob, tipe metabolisme respirasi menggunakan oksigen sebagai akseptor electron dan termasuk bakteri gram negative. Bakteri ini banyak ditemukan di tanah dan juga sering menyerang ikan air tawar. *Pseudomonas stutzeri* disebut juga sebagai dinitrifiers karena bakteri ini mampu merubah nitrat menjadi gas nitrogen. *Pseudomonas stutzeri* tidak bersifat patogen pada manusia dan pada tanaman inangnya (Hardhianto, 2010).

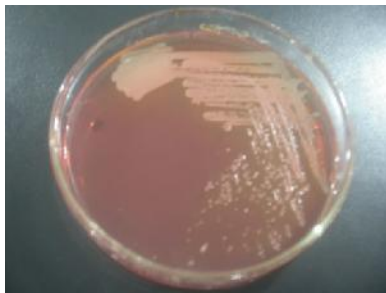


Gambar 5. Foto mikroskopis Bakteri *Pseudomonas stutzeri* Isolat BT2 (400x)

Isolat PD2 (*Bacillus brevis*)

Identifikasi pada Isolat PD2 menunjukkan adanya spora dimana bakteri ini dapat memfermentasikan gula-gula yaitu glukosa dan maltose, dapat tumbuh pada suhu 25°C, 37°C, 40°C dan 55°C dengan media spesifik nutrient broth dimana bakteri ini bersifat motil yang sensitive terhadap antibiotic penicillin, dapat mereduksi beta hemolisa, katalase dan oksidase.

Bacillus brevis memiliki warna koloni krem, tidak tembus cahaya, pinggiran terlihat rata, sifat elevasi adalah cembung, permukaan mengkilap dan berbentuk bulat atau tidak teratur dengan diameter 0,5-4,5 µm (Dias, 2003).



Gambar 6 Bakteri *Bacillus brevis* Isolat PD2 pada media nutrient agar



Gambar 7. Foto mikroskopis bakteri *Bacillus brevis* isolat PD2 (1000x)

Uji Aktifitas Metabolit Skunder Bakteri Endofit Dari Rimpang Temulawak Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis*

Pengamatan dilakukan setelah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C, diameter zona hambat dari uji aktifitas antibakteri bakteri endofit dari rimpang temulawak terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis* dapat dilihat pada 4.5.

Pan, *et al* (2009), menjelaskan bahwa kategori penghambatan antimikroba berdasarkan diameter zona hambat yaitu diameter 0-3 mm respon hambatan pertumbuhan lemah, diameter 3-6 mm respon hambatan pertumbuhan sedang dan diameter 6 mm respon hambatan pertumbuhan kuat. Berdasarkan Tabel.5, 4 isolat yang diuji aktifitas metabolit skunder bakteri endofit mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Hal ini menunjukkan bahwa mikroba endofit dari rimpang temulawak baik dari Kota Batu maupun Purwodadi mampu menghasilkan metabolit skunder sebagai antibakteri. Radji (2005) bakteri endofit memproduksi senyawa metabolit skunder sesuai dengan tanaman inangnya. Uji aktifitas metabolit bakteri endofit terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* berdasarkan Tabel 5, didapatkan zona hambat terbesar yaitu pada isolate BT2 dengan spesies *Pseudomonas stutzeri* menghasilkan zona hambat sebesar 5,6 mm. Zona hambat terkecil 3,3 mm pada isolate BT1 spesies *Actinomyces viscosus*.

Isolat PD2 spesies *Basillus brevis* menghasilkan zona hambat 4 mm, isolat PD1 sebesar 5

mm. Uji aktifitas metabolit bakteri endofit terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* berdasarkan Tabel 5 didapatkan zona hambat terbesar yaitu pada isolate PD2 spesies *Basillus brevis* zona hambat sebesar 4,7 mm. Hasil zona hambat terkecil 1,7 mm pada isolate PD1 spesies *Actinomyces viscosus*. Isolat BT1 spesies *Actinomyces viscosus* sebesar 3,7 mm dan isolat BT2 spesies *Pseudomonas stutzeri* sebesar 3,3 mm.

Aktifitas metabolit skunder isolat bakteri endofit dari rimpang temulawak secara *in vitro*

Kode Isolat	Spesies	Zona hambat (dalam mm)			
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
		Panjang	Keterangan	Panjang	Keterangan
BT1	<i>Actinomyces viscosus</i>	3,3	Sedang	3,7	Sedang
BT2	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	5,6	Sedang	3,3	Sedang
PD1	<i>Actinomyces viscosus</i>	5,0	Sedang	1,7	Lemah
PD2	<i>Basillus. Brevis</i>	4,0	Sedang	4,7	Sedang
	Kontrol Positif	13,5	Kuat	34	Kuat
	Kontrol Negatif	0	Tidak Menghambat	0	Tidak Menghambat

terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan bakteri *Staphylococcus epidermidis* menunjukkan adanya zona hambat dengan kriteria sedang. *Actinomyces viscosus* pada isolat PD1 menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan kriteria sedang (5 mm) dan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan kriteria lemah (1,7 mm). Senyawa aktif pada isolat PD1 lebih sensitive terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Menurut Tortora (2001), aktifitas antibiotik yang sensitif menghambat pertumbuhan bakteri baik golongan bakteri Gram Positif maupun Gram Negatif, dikatakan mempunyai spectrum yang luas. Sebaliknya suatu antibiotic yang hanya efektif terhadap golongan bakteri Gram tertentu dikatakan antibiotic spectrum sempit, seperti golongan penisilin yang aktif pada bakteri Gram Positif. Golongan streptomycin aktif menghambat pada golongan bakteri gram negative sedangkan tetracyclin mempunyai spectrum luas pada dua daerah bakteri Gram

Positif dan Gram Negatif. Semakin tinggi konsentrasi suatu zat antibakteri semakin tinggi daya hambat antibakterinya.

Tabel 5. Zona hambat pada uji aktifitas metabolit sekunder mikroba endofit terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis*

Keterangan: BT1=Isolat rimpang dari Batu, BT2=Isolat rimpang dari Batu, PD2=Isolat rimpang dari Purwodadi.

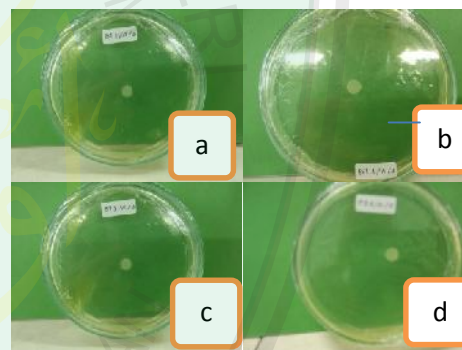
Factor biotik dan abiotic mempengaruhi produksi metabolite sekunder yang dihasilkan tiap isolat, dimana rimpang temulawak yang digunakan untuk isolasi didapat dari dua tempat yang berbeda yakni Batu dan Purwodadi dengan keadaan komposisi tanah, kondisi cuaca dan iklim yang berbeda. Temulawak mudah hidup dalam kondisi cuaca yang dingin seperti di daerah Batu, sehingga rimpang temulawak dari daerah Purwodadi diduga memiliki senyawa metabolit sekunder khusus yang lebih berkualitas daripada rimpang temulawak dari Batu karena adanya cekaman yang mengakibatkan perbedaan sekresi senyawa metabolit oleh rimpang temulawak. Semakin besar cekaman tanaman, maka semakin berkualitas metabolit sekunder yang disekresikan. Selama berada dalam tanaman bakteri endofit mendapatkan asupan makanan dari tanaman. Bakteri endofit memanipulasi tanaman dalam mengalihkan aliran nutrisi (misal hasil fotosintesis seperti sukrosa, fruktosa dan glukosa) menuju tempat kolonisasi bakteri (Kim, 2011). Zona hambat yang dihasilkan oleh metabolit sekunder bakteri endofit terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilihat pada gambar 10.

Menurut Strobel (2002), terbentuknya zona hambat juga dipengaruhi oleh factor lingkungan dan bakteri uji yang berlebihan sehingga pengaruh metabolit yang dihasilkan oleh bakteri endofit tidak signifikan terhadap pertumbuhan bakteri uji. Tabel 4.5 menunjukkan uji metabolit yang dihasilkan bakteri endofit dari semua isolate rimpang temulawak yang berasal dari kota Batu dan Purwodadi mempunyai potensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan bakteri *Staphylococcus epidermidis*, metabolit sekunder yang dihasilkan bakteri endofit kemungkinan menghasilkan senyawa kimia seperti yang dihasilkan tanaman temulawak. Menurut Aulmozi (2007) tanaman temulawak menghasilkan senyawa alkaloid, tanin dan flavonoid yang mampu digunakan sebagai antibakteri.

Mekanisme kerja senyawa yang bersifat antimikroba ada beberapa cara, yaitu penghambatan sintesis dinding sel yang menyebabkan kerusakan dinding sel sehingga terjadi lisis, perubahan permeabilitas membran sel atau transpor aktif melalui

membran sel yang dapat menyebabkan kebocoran dan kematian sel, penghambatan sintesis protein, dan penghambatan sintesis asam nukleat (Ramachandran dkk, 2004). Kemampuan tanin dalam menghambat pertumbuhan bakteri menurut Robinson (1991) yaitu dengan cara mempresipitasi protein, karena diduga tanin juga mempunyai efek yang sama dengan senyawa fenolik. Efek antibiotic tanin antara lain melalui: reaksi dengan membrane sel, inaktivasi enzim dan inaktivasi fungsi materi genetic.

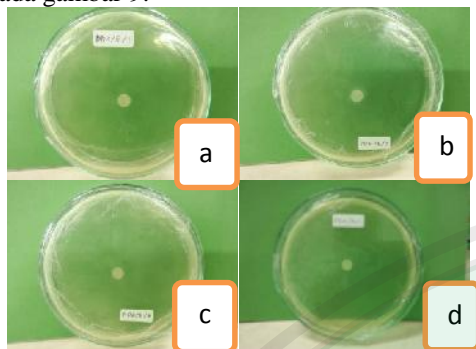
Saponin adalah senyawa aktif yang menimbulkan busa jika dikocok dalam air sehingga bersifat seperti sabun, memiliki molekul yang dapat melarutkan lemak atau lipofilik sehingga dapat mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, mengubah struktur dan fungsi membran, dan akhirnya menyebabkan membran sel akan rusak dan akhirnya lisis (Arabski *et al*, 2012). Menurut Robinson (1998), flavonoid merupakan senyawa fenol yang tersebar dalam tumbuhan karena flavonoid mempunyai banyak fungsi, pada tumbuhan yang mengandung flavonoid berfungsi sebagai pengatur tumbuh, fotosintesis, kerja antimikroba dan virus.



Gambar 8. Zona hambat hasil isolat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*
a. Isolat BT1, b. Isolat BT2, c. Isolat PD1 dan d. Isolat PD2

Penelitian ini menunjukkan bahwa rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhizae*) memiliki potensi sebagai penghasil senyawa antimikroba terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis* karena diduga didalam rimpang temulawak yang digunakan sebagai sampel terdapat senyawa xanthorrhizol, dimana senyawa ini tidak ditemui pada Curcuma lain. Hansel (1980) ekstrak segar temulawak memiliki senyawa antimikroba yang khas yaitu xanthorrhizol yang tidak dimiliki oleh rimpang Curcuma lainnya walaupun hanya dalam jumlah yang sangat kecil. Senyawa xanthorrhizol pada temulawak 6%. Hwang (2000) menyatakan aktifitas antimikroba dari xanthorrhizol mempunyai stabilitas yang baik terhadap panas, yakni pada temperature tinggi antara 60-121°C. Adapun zona hambat yang

dihasilkan oleh metabolit skunder bakteri endofit terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9 Zona Hambat hasil Isolat terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*
a. Isolat BT1, b. Isolat BT2, c. Isolat PD1 dan d. Isolat PD2

KESIMPULAN

Sebanyak 4 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*, yakni spesies *Actinomyces viscosus* dan *Pseudomonas stutzeri* dari Batu, *Actinomyces viscosus* dan *Bacillus brevis* dari Purwodadi. Zona

DAFTAR PUSTAKA

- Adila, Rahmi. 2013. Uji Antimikroba *Curcuma* spp. Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*, *Staphylococcus aerous* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Biologi Universitas Andalas* Vol 2 No. 1
- Arabski M, Wegierek-Ciuk A, Czerwonka G, Lankoff A, & Kaca W. 2012. Effect Of Saponin Againts Clinical *E.coli* Strains and Eukariotic Cell Lines. *Journal Of Biomedicine and Biotechnology* Vol 20 No 12
- Aulmozi, S dkk. 2007. *Aminociceptive and Anti-inflammatory Activites of Alstonia scholaris* Li.R.Br. An official pulication of phcog. Net. Phcog Mag. Vol 3 No 10
- Bergey's. 2005. *Manual of Systematic Bacteriology*. Department of Microbiology and Molecular Genetics: Michigan State University
- Fatmawati, D. A. 2008. *Pola Protein dan Kandungan Kurkuminoid Rimpang Temulawak (Curcuma xanthorrhiza Roxb.)*. [SKRIPSI]. Bandung: FMIPA ITB
- Hansel, R. 1980. *Pharmazeutische Biology*. Berlin: Springer-Verlag
- Hardhianto, Dwi Mochammad. 2010. Efektifitas Bakteri *Pseudomonas* Sebagai Pengurai Bhan Organik (Protein, Karbohidrat, Lemak) Pada Media Air Limbah Pembenuhan Ikan Lele Dumbo (*Clarias* so.) Sistem Resirkulasi Tertutup. *Journal of Ilmiah Perikanan dan Kelautan* Vol. 2 No. 2
- Hwang, J. K. 2000. Xhantorrhizol a Potential Antibacterial Agents From *Curcuma xanthorrhiza* Againts *Streptococcus mutans*. *Journal of Planta Mend* Vol 66 No 196
- Kim, Y.C. 2011. The Multifactoral Basis for Plant Health Promotion by Pant Associated Bacteria. *Minireview Applied and Environmental Microbiology* Vol 77 No 5
- Komala, Putri Sri. 2012. Identification Of Anaerobic Dominant Microies In Rubber Industrial Waste Treatment With Multi Soil Layering (MSL) System. *Jurnal Teknik Lingkungan UNAND* Vol 9 No 1

hambat terhadap bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* didapat 3,3 mm untuk *Actinomyces viscosus* dari Batu, 5,6 mm untuk *Pseudomonas stutzeri*, 5 mm untuk *Actinomyces viscosus* dari Purwodadi dan 4 mm untuk *Bacillus brevis*. Zona hambat terhadap bakteri uji *Staphylococcus epidermidis* didapat 3,7 mm untuk *Actinomyces viscosus* dari Batu, 3,3 mm untuk *Pseudomonas stutzeri*, 1,7 mm untuk *Actinomyces viscosus* dari Purwodadi dan 4,7 mm untuk *Bacillus brevis*.

- Nikham. 2006. Kepekaan *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* Terhadap Ekstrak Daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn) Iradiasi. *Journal Of Risalah Seminar Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*
- Nur, S. W. 2006. *Perbandingan Sistem Ekstraksi dan Validasi Penentuan Xanthorhizol dari Temulawak Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. [SKRIPSI]. Bandung: ITB
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., dan Zhao, Z. 2009. The Acid, Bile Tolerance and Antimicrobial roperty of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Journal of Food Control Vol 20 No 598*
- Prihatiningtias, Widyati. 2005. *Prospek Mikroba Endofit Sebagai Sumber Senyawa Bioaktif*. Yogyakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
- Radji, Maksum. 2005. *Peranan Bioteknologi Dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. Laboratorium Mikrobiologi Bioteknologi Vol. II. Departemen Farmasi, FMIPA-UI, Kampus Depok 113 – 126. Departemen Farmasi, FMIPA-UI Depok 16424 Majalah Ilmu Kefarmasian No 3 Desember 2005.*
- Ramachandran. 2004. *Serba-serbi Kesehatan*. Jakarta: Bukune
- Roberts M., M. E. Mercade, M. P. Bosch, J. L. Parra, M. J. Espuny, M. A. Manresa dan J. Guinea. 1989. Effect of Carbon Source on Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Journal Of Biotech Lett. 11:871-874*
- Robinson, Trevor. 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Terjemahan Kosasih Padmawinata*. Bandung : ITB
- Robinson, Trevor. 1998. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Terjemahan Kosasih Padmawinata*. Bandung : ITB
- Rosenblatt, J.E. 1980. *Antimicrobial Susceptibility Testing Af Anaerobes*. Dalam Lorian, V. (ed). 1980. *Antibiotics in laboratory medicine*. London: Williams & Wilkins
- Simarmata, Rumella, Sylvia Lekatompessy dan Harmastini Sukiman. 2007. Isolasi Mikroba Endofitik Dari Tanaman Obat Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) Dan Analisis Potensinya Sebagai Antimikroba. *Berk. Penel. Hayati: Vol 13 No. 85*
- Strobel, G.A. 2000. Endophytic Fungi : New Sources For Old and New Pharmaceuticals. *Pharmaceutical News Vol 3 No 6*
- Strobel, G.A. 2002. *Microbial Gifts From Rainforests*. Can. J. Plant Phathology. Vol 24 No 14-20
- Susilowati. Tanpa tahun. *Isolasi dan Seleksi Mikroba Diazotrof Endofitik dan Penghasil Zat Pemacu Tumbuh pada Tanaman Padi dan Jagung*. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetic Pertanian.
- Tortora, et al. 2001. *Microbiology in Introduction. International Edition* . New York Benjamin Cummings, Inc