

AKTIVITAS ANTIMIKROBA METABOLIT BIOAKTIF MIKROBA ENDOFITIK TANAMAN TRENGGULI (*Cassia fistula* L.)

Shirly Kumala¹⁾, Fransisca Shanny¹⁾, dan Priyo Wahyudi²⁾

¹⁾Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta, ²⁾BPPT, Jakarta

ABSTRACT

Endophytic microbes are microorganisms that live symptomatically within the living tissue of host plants. Microbe as fungi, yeast and bacteria can associate with the plant; they can help the metabolism of the host plant and produce the potential secondary metabolite. The aims of this experiment were to investigate endophytic microbes that live in the *Cassia fistula* L (Trengguli) plant and their ability to produce bioactive metabolite as anti microbial agents. Direct seed inoculating technique was used by putting the plant sample on the surface of Nutrient Agar. The agar diffusion method using paper disc was applied to assay the anti microbial activity of bioactive metabolite. The results showed 7 isolate of bacteria had the anti microbial activity toward *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Candida albicans*. Endophytic bacteria can be found in *Cassia fistula* L plant, which can produce potential bioactive metabolite as anti microbial agent.

Keywords: antimicrobial, endophyte, Cassia fistula L.

ABSTRAK

Mikroba endofit adalah mikroorganisme yang hidup secara simptomatis di dalam jaringan hidup tanaman inangnya. Mikroba tertentu, misalnya jamur, ragi dan bakteri dapat berasosiasi dengan tanaman tersebut; mikroba-mikroba ini dapat membantu metabolisme tanaman inangnya dan memproduksi metabolit sekunder yang potensial. Tujuan penelitian ini adalah menyelidiki mikroba endofit yang tumbuh di dalam jaringan Trengguli (*Cassia fistula* L), dan kemampuannya untuk memproduksi metabolit bioaktif yang memiliki aktivitas antimikrobal. Dalam penelitian ini digunakan teknik inokulasi langsung dengan jalan meletakkan sampel tanaman langsung di atas permukaan *Nutrient Agar*. Metoda difusi agar menggunakan cakram kertas digunakan untuk menetapkan aktivitas antimikrobal dari metabolit aktif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 7 isolat bakteri memiliki aktivitas antimikrobal terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* dan *Candida albicans*. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa di dalam jaringan tanaman *Cassia fistula* L dapat ditemukan bakteri endofit yang dapat memproduksi metabolit bioaktif sebagai senyawa antimikrobal.

Keywords: antimikrobal, endofit, Cassia fistula L.

PENDAHULUAN

Prevalensi penyakit infeksi masih cukup tinggi di Indonesia, salah satu penyebabnya karena biaya pengobatan yang cukup tinggi sehingga belum dapat terjangkau bagi

seluruh masyarakat khususnya bagi masyarakat kelas menengah kebawah. Hal ini mendorong para ahli untuk mencari sumber bahan baku obat dari bahan alam yang dapat digunakan untuk produksi obat

khususnya anti mikroba dengan harapan dapat menekan harga obat.

Tanaman dapat menjadi sumber bahan baku obat, bagian tanaman yang dapat digunakan dapat berupa herba (tanaman utuh), bagian kulit kayu atau daun atau eksudat tanaman. Indonesia merupakan negara yang memiliki iklim tropis dan kaya akan keaneka ragam tumbuhan [1]. Salah satu dari keaneka ragam tumbuhan adalah tumbuhan yang berkhasiat obat seperti tanaman Trengguli (*Cassia fistula* L) Trengguli mengandung glikosida, flavonoid, krisopanol, rheim, dan senoside A,B [2]. Tanaman ini sebenarnya adalah tanaman hias. Bunganya yang berwarna kuning dan harum banyak dimanfaatkan orang untuk tanaman yang menghiasi pekarangan dan dapat juga digunakan sebagai tanaman pelindung [3], namun selain itu tanaman ini juga dapat dimanfaatkan untuk menyembuhkan beberapa penyakit seperti, panu, kadas, bisul, borok, koreng, luka bakar, jerawat, pusing-pusing, cacar air, dan urus-urus atau mencret [3,4,5].

Mikroba endofitik adalah mikroba yang seluruh atau sebagian hidupnya berada di dalam jaringan hidup tanaman inang tanpa menimbulkan gejala yang merugikan bagi tanaman inang itu sendiri [6]. Mikroba seperti kapang, khamir dan bakteri dapat berasosiasi dengan tanaman, membantu metabolisme tanaman inang dan menghasilkan metabolit sekunder yang berpotensi [7,8]. Dari beberapa hasil penelitian mengenai mikroba endofitik yang telah dilakukan menunjukkan bahwa mikroba endofitik dapat berperan dalam menghasilkan metabolit bioaktif. Metabolit bioaktif yang dihasilkan mikroba endofitik dapat berupa senyawa anti mikroba yang dapat menghambat pertumbuhan jenis

mikroba lainnya termasuk anti bakteri, anti jamur, enzim-enzim perombak, zat pengatur tumbuh tanaman, dan anti tumor. Metabolit bioaktif yang dihasilkan ini dapat bermanfaat dibidang industri, pertanian, maupun farmasi [6]. Dengan diketahuinya potensi mikroba endofitik dalam menghasilkan metabolit bioaktif ini, perlu dikembangkan. penelitian dibidang endofit. khususnya bagi tanaman di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman mikroba endofitik yang berada dalam tanaman Trengguli (*Cassia fistula* L) serta mengetahui kemampuan menghasilkan metabolit bioaktif yang mempunyai aktivitas sebagai anti mikroba.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Skalpel, laminar Air Flow Cabinet (Gelman Sciences PTY. LTD), cawan Petri dengan diameter 10 cm dan 20 cm, Inkubator (Mettler), lampu spiritus, mikro pipet, jarum, shaker (Heidolph promax 1020), sentrifuge (Maxi Mix Plus TM), Autoklaf (Hirayama), spatula, lemari pendingin (National NR-125 SA), Mikroskop (Olympus), kertas saring, dan kertas indikator.

Air suling, alkohol 75 %, NaOCl 5,3 %, medium agar NA (Oxoid), medium agar PDA (Difco), Gliserol (IKA), SBM (*Soy Bean Meal*), NaCl, Yeast extract, CSL (*Corn Steep Liquor*), CaCO₃, NaOH 1 N (BDH Analar)

Staphylococcus aureus berasal dari ATCC 25923, *Bacillus subtilis* berasal dari ATCC 6633, *Escherichia coli* berasal dari ATCC 25922, *Salmonella typhi* berasal dari MUI 00302, *Candida albicans* berasal dari ATCC 10231, Gentian violet 0,5 %, Lugol Iodine, Larutan Fuchsin, Nutrient Broth (Oxoid), Potato Dextrose Broth (Oxoid)

Cara kerja

Pengambilan sampel: Sampel tanaman Trengguli (*Cassia fistula* L.) yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Kebun Penelitian BALITRO, Cimanggu, Bogor. Bagian tanaman yang diambil adalah ranting tanaman yang sehat dengan panjang ± 2 cm.

Persiapan awal: Alat yang digunakan harus dalam keadaan bersih dan disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan. Medium yang dipakai dipersiapkan sesuai dengan petunjuk yang ada pada pustaka atau pada botol medium yang bersangkutan. Sebelum digunakan, medium harus disterilkan terlebih dahulu.

Isolasi bakteri endofitik dari tanaman Trengguli (Cassia fistula L.) dan pengamatan koloni: Ranting tanaman dibuang daunnya, kemudian dipotong dengan panjang ± 2 cm. Dilakukan pencucian di bawah air mengalir selama 10 menit. Dengan menggunakan metode sterilisasi permukaan dalam *Laminar Air Flow Cabinet* potongan tersebut dimasukkan ke dalam Etanol 75 % selama 1 menit. Lalu dipindahkan ke dalam larutan NaOCl 5,3 % selama 5 menit. Selanjutnya dibilas dengan Etanol 75 % selama 30 detik. Lalu potongan tersebut diletakkan di atas kaca obyek selama 1 menit. Langkah berikutnya adalah membelah potongan tersebut dengan skalpel menjadi 2 bagian yang sama besar secara membujur. Masing-masing bagian diletakkan di atas medium NA dengan posisi permukaan belahan menempel pada medium agar. Inkubasi selama 5-7 hari pada suhu 27-29°C [10].

Pengamatan koloni dilakukan berdasarkan kriteria : warna, permukaan, dan tepian koloni. Kriteria-kriteria yang sama dianggap

sebagai isolat yang sama dan sebaliknya kriteria-kriteria yang menunjukkan perbedaan dianggap sebagai isolat yang berbeda. Setiap koloni dengan morfologi berbeda dipisahkan menjadi isolat-isolat sendiri. Pengamatan morfologi dilakukan kembali setelah inkubasi selama 5-7 hari. Apabila masih ditemukan pertumbuhan koloni yang berbeda, maka harus dipisahkan lagi sampai diperoleh isolat murni, yaitu hanya mengandung 1 bentuk morfologi koloni yang sama. Kemudian masing-masing isolat murni dipindahkan ke dalam 5 agar miring sebagai biakan untuk penelitian [11].

Pengamatan morfologi bakteri endofitik dan pewarnaan Gram: Satu ose koloni bakteri dioleskan di atas permukaan kaca obyek. Fiksasi bakteri dilakukan dengan cara melewatkan kaca obyek di atas nyala Bunzen selama 2-3 kali. Kemudian ditambahkan larutan Gentian violet 0,5% selama 5 menit setelah itu zat warna dibuang dan selanjutnya diteteskan larutan Lugol iodine didiamkan selama 45 – 60 detik. Lalu sediaan dimasukkan ke dalam larutan alkohol 96% selama 30 detik, sambil digoyang sampai tidak terjadi zat warna yang mengalir di atas sediaan. Lalu dibilas dengan air kran. Larutan Fuchsin 0,5% ditambahkan, didiamkan selama 1 – 2 menit, dibilas dengan air kran, dan dikeringkan di atas kertas saring. Pengamatan morfologi dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 X. Dilakukan pencatatan jenis bakteri Gram positif atau Gram negatif, serta bentuk sel bakteri [12].

Fermentasi produksi senyawa antimikroba: Dilakukan fermentasi cair dengan menggunakan medium fermentasi F-4 sebanyak 10,0 ml dalam tabung reaksi diameter 2 cm.

Inkubasi dilakukan pada suhu ruang (27°C) selama 2 hari dengan kecepatan shaker 170 rpm. Biomassa sel dipanen dengan menggunakan sentrifuge berpendingin 3000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan dari hasil sentrifuge digunakan untuk uji hayati [13,14].

Uji hayati: Dilakukan dengan teknik kertas cakram menggunakan mikroba uji Gram (+); *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*, mikroba uji Gram (-), *Escherichia coli* dan *Salmonella typhii*, dan khamir *Candida albicans*. Media untuk uji hayati adalah NA (Nutrien Agar) untuk menumbuhkan bakteri, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhii*, dan *Staphylococcus aureus*, serta PDA (*Potato Dextrose Agar*) digunakan untuk menumbuhkan khamir *Candida albicans* [9].

a. Persiapan mikroba uji dengan perhitungan ALT (Angka Lempeng Total): Dari 1 sengkeli biakan stok mikroba uji ditumbuhkan dalam medium NB (untuk bakteri) dan PDB (untuk khamir). Inkubasi dilakukan pada suhu 36°C selama 24 jam. Dilakukan hal yang sama dengan menumbuhkan pada medium NA dan PDA. Selanjutnya diukur T (transmitan) dari kepadatan koloni mikroba uji dalam biakan cair pada λ 580 nm dan diset nilai transmittannya adalah 25%. Lalu dilakukan perhitungan kepadatan mikroba uji dengan metode ALT (Angka Lempeng Total) [12].

b. Pelaksanaan uji hayati: Uji hayati dilakukan dengan mencelupkan kertas cakram steril ke dalam supernatan dan diletakkan di atas medium agar yang telah diinokulasi oleh mikroba uji sebanyak 5 %. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 2 hari. Pengamatan

dilakukan terhadap ada tidaknya zona hambatan di sekitar kertas cakram dan diukur [9,15].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Cara untuk mendapatkan mikroba dari alam adalah dengan melakukan isolasi. Isolasi yang dilakukan untuk mendapatkan bakteri endofitik dari tanaman Trengguli dilakukan dengan metode tanam langsung dari sampel berupa ranting tanaman ke dalam medium agar. Dari isolasi ini diperoleh 7 isolat bakteri endofitik, 5 di antaranya termasuk ke dalam kelompok Gram negatif dan 2 lainnya termasuk kelompok Gram positif. Dari ketujuh isolat bakteri endofitik tersebut mempunyai bentuk sel yang sama yaitu berbentuk kokus. Identifikasi tidak dilakukan pada penelitian ini karena untuk melakukan identifikasi tersebut diperlukan pengujian yang banyak berdasarkan kunci Bergey's manual yang cukup rumit. Pada penelitian ini isolasi terhadap bakteri endofitik tanaman Trengguli dibatasi hanya sampai pengamatan morfologi dan pengelompokan berdasarkan pewarnaan Gram selnya. Titik berat dari penelitian ini adalah pada penapisan potensi bakteri endofitik dalam menghasilkan senyawa antimikroba.

Pengujian potensi tersebut dilakukan dengan terlebih dahulu menumbuhkan isolat-isolat bakteri tersebut pada medium yang umum digunakan dalam penapisan senyawa antimikroba. Medium yang digunakan umumnya mengandung sumber karbon yang kompleks karena salah satu faktor yang mempengaruhi mikroorganisme dalam menghasilkan metabolit sekunder adalah kekomplekskan medium. Kompleksitas suatu medium pada hakekatnya merupakan kondisi kritis

dimana mikroba umumnya akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder untuk mempertahankan hidupnya. Pada medium F-4 mengandung gliserol dan CSL yang keduanya merupakan sumber karbon kompleks.

Dari hasil fermentasi dengan medium F-4 terbukti ketujuh isolat bakteri endofitik mampu menghasilkan senyawa antimikroba. Hal tersebut dibuktikan dengan terbentuknya zona jernih di sekitar kertas cakram yang menandakan terjadinya zona penghambat pertumbuhan mikroba uji oleh metabolit yang dihasilkan. Sebanyak 4 jenis bakteri yang digunakan yaitu *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhii*, dan 1 khamir *Candida albicans*

yang diujikan ternyata mempunyai kepekaan terhadap senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri endofitik. Dari kelima mikroba uji tersebut terlihat bahwa *S. aureus* lebih peka terhadap senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri endofitik, diikuti oleh *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans*, dan terakhir *S. typhii*. Kepekaan mikroba uji ditandai dengan besar diameter zona jernih yang terbentuk. Makin besar zona jernih makin peka mikroba uji terhadap senyawa antimikroba tersebut. Dari hasil penelitian menunjukkan ada kemungkinan senyawa anti mikroba yang dihasilkan dari bakteri endofitik bersifat spektrum luas karena terbukti mampu mengendalikan bakteri Gram positif, Gram negatif, maupun khamir.

Tabel 1
Data hasil uji hayati supernatan isolat bakteri endofitik dari tanaman Trengguli (*Cassia fistula* L.)

| No. | Kode isolat | Mikroba uji | | | | |
|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|---------|-----------|
| | | S. aureus | B. subtilis | C. albicans | E. coli | S. typhii |
| 1. | N A31-1 | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ |
| 2. | N A31-2 | +++ | ++ | ++ | ++ | + |
| 3. | N C3-1 | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ |
| 4. | N D31-1 | +++ | ++ | ++ | + | + |
| 5. | P D2-1 | +++ | ++ | ++ | ++ | + |
| 6. | P D21-1 | + | + | + | ++ | ++ |
| 7. | N D31-2 | + | + | + | + | + |
| 8. | Kontrol | - | - | - | - | - |

Keterangan :

- + = Menunjukkan zona jernih dengan diameter
 + : 0,00 cm < \varnothing < 1,00 cm
 ++ : 1,00 < \varnothing < 1,50 cm
 +++ : 1,50 < \varnothing ≤ 2,00 cm
 ++++ : > 2,00 cm
 - = tidak menunjukkan zona jernih

Dari hasil penapisan juga diketahui bahwa ternyata terdapat 2 isolat

bakteri yaitu P D21-1 dan N D31-2 yang daya antimikrobanya relatif lebih

lemah dibandingkan 5 isolat lainnya. Hal tersebut dapat dilihat dari diameter zona jernih yang lebih kecil dibanding zona jernih yang terbentuk dari kelima isolat lainnya.

Hasil penelitian ini masih sangat dini untuk mengetahui potensi dari sumber daya genetik baru yang belum banyak dieksplorasi oleh manusia., namun dapat memberikan gambaran akan potensi dari metabolit bioaktif mikroba endofitik dari tanaman *Cassia fistula* untuk dikembangkan sebagai sumber bahan baku obat

KESIMPULAN

Dari penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Dari tanaman Trengguli (*Cassia fistula* L.) dapat diisolasi bakteri endofitik yang berpotensi menghasilkan senyawa antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*.
2. Bakteri *Staphylococcus aureus* lebih peka terhadap senyawa antimikroba yang dihasilkan bakteri endofitik, dibandingkan dengan bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, dan *Salmonella typhi*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Direktorat Jenderal Pengawasan obat, Material Medika Indonesia, 1977, Jakarta, Departemen Kesehatan Indonesi XI, .
2. Haryanto Y .Percobaan pendahuluan efek anti mikroba infus daun *Cassia fistula* L , terhadap *S. aureus* strain Oxford, Skripsi FMIPA UI 1995.

3. Mardiswojo S, Radjakmangun H. Cabe puyang warisan nenek moyang.Edisi I. Jakarta : Balai Pustaka; 1987. hal. 119.
4. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Pemanfaatan Tanaman Obat. Edisi III. Jakarta: Husada; 1983. hal. 28 – 49.
5. Petrini O, Sieber TN, Toti L, Viret O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxin*; 1992. hal. 185 – 196.
6. Strobel GA., Hess WM., Ford E., Sidhu RS,and Yang X., Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity, *Journal of Industrial Microbiology*, 1996; 17 ; 417 - 423
7. Strobel GA, Microbial gifts from rain forests. Symposium contribution, *Can. J Plant Pathol*, 2003, 24, 14 - 20
8. Tomita F. Screening of useful strains. In international post Graduate University Courses in Microbiology Japanese National Commission for UNESCO; 1985. hal. 223-33.
9. Bacon CW. Prosedure for isolating the endophytes from fall rescue and screening isolates for ergot alkaloid. *Appl. Environ. Microbiol* 54. 1988. hal. 2615 – 2618.
10. Wahyudi P. Isolasi mikroba endofitik tanaman tropis Indonesia. Laporan Teknis. Jakarta : BPPT; 1997. hal. 2.
11. Hadioetomo Ratna Siri. Mikrobiologi dasar dalam praktek, teknik, dan prosedur dasar laboratorium. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB. Jakarta: PT. Gramedia; 1985. hal. 60 – 104.
12. Judoamidjojo M, Darwis AA., Said EG., Teknologi fermentasi. Bogor: PAU.Bioteknologi. IPB, 1992, 45 - 50
13. Rahman A. Teknologi fermentasi.Bogor. PAU.Bioteknologi.IPB ;1992, 1 - 2
14. Miles CO, et al. Endophytic fungi Indigenous Australasian Grasses Associated with Toxicity of Livestock. *Appl and Environ Microbio*. American Society for Microbiology; 1998. hal. 601 – 6