

Kemampuan Antibakteri Senyawa Metabolit Sekunder Bakteri Endofit Tanaman Purwoceng terhadap *Escherechia coli*

Nur'aini Kartikasari^{1*}, Yekti Asih Purwestri²

¹Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Malang, Malang

²Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

*E-mail: nuraini.kartikasari.fmipa@um.ac.id

Abstrak. Kajian tentang senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri endofit mulai bermunculan untuk mengatasi meningkatnya bakteri resisten obat seperti *Escherechia coli*. Bakteri endofit (GP14, GP2 dan DG1) yang diisolasi dari purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molkend) telah diketahui memiliki potensin dalam mencegah pertumbuhan bakteri patogen. Pada penelitian ini isolat GP14, GP 2 dan DG 1 menunjukkan aktivitas untuk mencegah pertumbuhan *E. coli*. Senyawa bioaktif diekstraksi dari kultur cair menggunakan etil asetat, diikuti dengan uji *Thin layer chromatography* (TLC) sebagai uji profil metabolik untuk mengidentifikasi golongan senyawa kimia. Uji TLC menunjukkan bahwa isolat GP14, GP2 dan DG1 menghasilkan senyawa alkaloid. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode *paper disc diffusion* dengan media TSA. Konsentrasi yang digunakan adalah 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml dan 200 mg/ml. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar hasil ekstraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*. Zona hambat terbesar ditunjukkan dari ekstrak kasar isolat DG1 pada konsentrasi 200 mg/mL yaitu 2.135 mm.

Kata Kunci: Antibakteri; bakteri endofit; purwoceng; *Escherechia coli*; TLC.

Abstract. Study about antibacteria compound that produced by endophytic bacteria become emerging to fight the increasing of drug resistant bacteria such as *Escherechia coli*. Endophytic bacteria (GP14, GP2 and DG1) that isolated from purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molkend) have been screened for their potential in preventing the growth of pathogen bacteria. In present study isolate GP14, GP 2 and DG 1 showed the activity to prevent the growth of *E. coli*. Bioactive compounds were extracted from culture broth using ethyl acetate, followed by Thin layer chromatography (TLC) for metabolic profiling to identify the chemical class of compounds. TLC assay showed that GP14, GP2 and DG1 isolate produce alkaloid compound. Antibacterial activity assay using paper disc diffusion method with TSA media. The concentrations used were 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml and 200 mg/ml. The results showed that the crude extract from etil acetate extraction had antibacterial activity against *E. coli*. The largest inhibition zone showed from crude extract DG1 isolate at the concentration of 200 mg/mL, which was 2,135 mm.

Keywords: Antibacterial; endophytic bacteria; purwoceng; *Escherechia coli*; TLC.

PENDAHULUAN

Sebagian besar penyakit infeksi yang diderita oleh masyarakat Indonesia merupakan penyakit infeksi akibat mikroba patogen (Angelina et al., 2015). *E. coli* merupakan salah satu mikroba patogen yang dapat menyebabkan penyakit infeksi. Salah satu penyakit infeksi yang disebabkan oleh *E. coli* adalah Infeksi Saluran Kemih (ISK). Penyakit ISK baik yang asimptomatik maupun ringan dapat menimbulkan komplikasi berat seperti sepsis, gagal ginjal hingga kematian jika tidak ditangani sejak dini (Endriani et al., 2009; Syahputra et al., 2018).

Pemberian antibiotik merupakan salah satu cara untuk pengobatan penyakit infeksi. Pemberian antibiotik ini dibarengi dengan berbagai resiko, salah satunya adalah timbulnya resistensi mikroba patogen terhadap antibiotik tertentu (Satari, 2012). *E. coli* adalah salah satu bakteri patogen yang saat ini menunjukkan gejala resisten terhadap antibiotik. Contohnya *E. coli* mampu menghasilkan enzim betalaktamase yang merupakan penyebab terjadinya resistensi terhadap antibiotik golongan betalaktam (Firizki, 2014). Hingga saat ini peningkatan resistensi dari bakteri patogen terhadap antibiotik menyebabkan perlu adanya penemuan alternatif baru dari bahan baku alami seperti tanaman obat untuk mengatasi masalah tersebut.

Indonesia dikenal sebagai negara dengan kenakeragaman hayati terbesar kedua setelah Brazil memiliki potensi yang sangat besar dalam mengembangkan obat herbal dengan tanaman asli Indonesia (Radji, 2005). Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molken) merupakan tanaman asli Indonesia dan merupakan tanaman herba komersial yang memiliki kandungan senyawa kumarin dan turunannya (furanokumarin), sterol, alkaloid, saponin, dan beberapa macam oligosakarida. Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman tersebut memiliki aktivitas sebagai antimikroba, antikoagulan dan antiinflamasi. Kemampuan senyawa metabolit sekunder dari purwoceng sebagai antimikroba dapat dimanfaatkan untuk menekan pertumbuhan bakteri patogen (Darwati & Roostika, 2006).

Pada jaringan suatu tanaman obat terdapat setidaknya satu spesies mikroba endofit (Tan & Zou, 2001; Strobel, *et al.*, 2004). Mikrobia endofit dapat menghasilkan senyawa metabolit yang memiliki karakteristik senyawa metabolit yang sama dengan tanaman inangnya. Penggunaan mikroba endofit untuk memproduksi metabolit sekunder merupakan salah satu cara untuk memperoleh senyawa antibakteri dalam waktu singkat. Widayat & Soetarto (2012) melaporkan bahwa bakteri endofit yang diisolasi dari tanaman purwoceng mengindikasikan kemampuan menghasilkan senyawa kumarin. Menurut Wilson (2014) terdapat bakteri endofit pada akar tanaman purwoceng yang berasal dari gunung Putri Jawa Barat, dataran tinggi Dieng Jawa Tengah dan desa Ranu Pane di kawasan TNBTS Jawa Timur. Senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri endofit dari tanaman purwoceng mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Purwestri *et. al.*, 2016). Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian mengenai kemampuan antibakteri metabolit sekunder bakteri endofit tanaman purwoceng terhadap *E. coli*.

MATERIAL DAN METODE

Isolat Bakteri Endofit

Tiga isolat bakteri endofit GP2, GP14 dan DG1 diperoleh dari penelitian sebelumnya. Isolat bakteri endofit GP2, GP14 dan DG1 yang telah disimpan di dalam larutan gliserol ditumbuhkan dalam media *Tryptic Soy Broth* (TSB) kemudian di subkultur ke media *Tryptic Soy Agar* (TSA).

Optimasi Waktu Inkubasi

Optimasi waktu inkubasi dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri endofit pada media TSB untuk mengetahui fase stasioner pada kurva pertumbuhan bakteri. Isolat yang ditumbuhkan di tumbuhkan pada media TSB di amati setiap 2 jam sekali selama 48 jam atau hingga di peroleh fase kematian. Pengamatan dilakukan dengan mengukur *Optical Density* (OD) kultur isolat menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

Produksi dan Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder dari Bakteri Endofit

Isolat bakteri endofit diinokulasikan sebanyak 1 oose ke dalam 30 ml media TSB dan diinkubasi pada suhu 37°C, 120 rpm selama 24 jam dan digunakan sebagai stok inokulum. Stok inokulum tersebut diencerkan dengan menggunakan larutan NaCl 0.9% steril untuk memperoleh jumlah sel 10^8 CFU/ml. Aliquot suspensi yang diperoleh diinokulasikan sebanyak 30 ml ke dalam 270 ml media TSB yang digunakan untuk produksi senyawa antibakteri dan diinkubasi pada suhu 37°C, 120 rpm dengan waktu inkubasi yang telah diperoleh dari waktu inkubasi optimum.

Ekstraksi dilakukan dengan cara media produksi yang telah telah diinkubasi disentrifugasi pada suhu 4°C, 12,000 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi disaring menggunakan kertas saring untuk memperoleh *cell free supernatan*. *Cell free supernatan* kemudian ditambah dengan larutan etil asetat dengan perbandingan 1:1 dan dihomogenkan. Larutan *cell free supernatan* dan etil asetat dimasukkan ke dalam corong pisah dan didiamkan hingga terbentuk tiga lapisan. Lapisan bagian tengah (senyawa antibakteri) dan atas (etil asetat) pada corong pisah ditampung dalam cawan porselen. Etil asetat dalam cawan selanjutnya dievaporasi untuk memperoleh ekstrak kasar (*crude*) senyawa metabolit sekunder.

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Senyawa Metabolit Sekunder terhadap *E. coli*

Ekstrak kasar ditimbang dan dilarutkan dalam akuades steril dengan konsentrasi (25, 50, 100 dan 200 mg/ml). Bakteri *E. coli* diinokulasikan sebanyak 1 oose ke dalam 5 ml NaCl 0.9% steril untuk memperoleh jumlah sel 10^8 CFU/ml. Aliquot suspensi diinokulasikan sebanyak 100 μ l ke dalam media TSA dengan metode *spread plate*. Larutan ekstrak uji + akuades, akuades (kontrol negatif) dan *amoxycilin* (kontrol positif) diteteskan sebanyak 20 μ l pada kertas cakram (diameter 6

mm) steril. Kertas cakram tersebut kemudian diletakkan pada media TSA yang telah diinokulasi dengan *E. coli* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening di sekitar kertas cakram setelah inkubasi 24 jam merupakan zona hambat terhadap *E. coli*.

Identifikasi Golongan Senyawa Antibakteri Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak senyawa antibakteri dan senyawa pembanding diencerkan sedikit dengan pelarut akuades kemudian ditotolkan pada plat KLT yang mengandung silika gel 60 F₂₅₄. Plat KLT selanjutnya dimasukkan ke dalam bejana kaca yang berisi eluen (ethyl acetate : n-hexane 4:6 v/v). Plat selanjutnya dikeringkan dan disemprot dengan menggunakan reagen Dragendorff. Spot senyawa antibakteri yang terbentuk pada plat diamati pada sinar tampak dan UV dengan panjang gelombang 254 nm. Silika gel pada uji KLT mengandung indikator fluoresensi yang membantu mendeteksi kedudukan spot yang terpisah selama senyawa yang dipisahkan menyerap UV.

HASIL

Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder

Senyawa metabolit sekunder yang diproduksi oleh bakteri endofit di dalam media fermentasi diekstraksi dengan menggunakan etil asetat. Penggunaan larutan etil asetat dikarenakan larutan tersebut merupakan pelarut semi polar yang dapat melarutkan senyawa polar dan non polar, memiliki tingkat toksisitas yang rendah dan mudah terevaporasi (Rowe, et. al, 2009; Wardhani & Sulistyani, 2012). Ekstrak kasar yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan menggunakan etil asetat memiliki warna putih kekuningan.

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Senyawa Metabolit Sekunder terhadap *E. coli*

Hasil dari uji aktivitas antibakteri ekstrak senyawa metabolit sekunder terhadap *E. coli* ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Senyawa Metabolit Sekunder terhadap *E. coli*

Isolat	Konsentrasi (mg/mL)	Zona Hambat (mm)
GP14	200	1,807 ± 0,249
	100	1,612 ± 0,133
	50	1,333 ± 0,067
	25	1,166 ± 0,153
GP2	200	2,053 ± 0,155
	100	1,722 ± 0,201
	50	1,678 ± 0,117
	25	1,542 ± 0,091

DG1	200	2,135 ± 0,288
	100	1,811 ± 0,222
	50	1,678 ± 0,171
	25	1,478 ± 0,309
	Kontrol (Amox)*	20

*Amox = Amoxicilin

Identifikasi Golongan Senyawa Antibakteri Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil identifikasi ekstrak kasar senyawa metabolit sekunder dari isolat GP14, GP2 dan DG1 dengan menggunakan metode KLT menunjukkan sebagai senyawa alkaloid. Senyawa alkaloid merupakan senyawa bioaktif yang memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen.

PEMBAHASAN

Pada uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar dari ketiga isolat terlihat mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Zona hambat ekstrak kasar isolat dari ketiga isolat bakteri endofit tidak berbeda jauh dari zona hambat yang di hasilkan oleh amoxicilin (kontrol positif). Hal tersebut mengindikasikan bahwa kemampuan senyawa antibakteri yang terdapat pada ekstrak kasar dari ketiga isolat dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* sama baiknya dengan antibiotik amoxicilin. Kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen ini sama dengan kemampuan antibakteri yang dimiliki oleh tanaman purwoceng. Menurut Tan & Zou (2001) dan Strobel & Daisy (2003) mikroba endofit memiliki kemampuan untuk memproduksi senyawa bioaktif yang sama dengan tanaman inang melalui proses koevolusi. Kemampuan menghasilkan senyawa antibakteri selama proses fermentasi oleh bakteri endofit dari tanaman purwoceng terjadi selama fase stasioner. Menurut Pelczar & Chan (1986) dan Pratiwi (2008) bakteri endofit mampu memproduksi senyawa metabolit sekunder selama fase stasioner. Sintesis metabolit sekunder mulai diproduksi oleh mikroorganisme ketika nutrisi pada media tempat tumbuh berkurang. Keterbatasan nutrisi tersebut menyebabkan mikroorganisme melepaskan enzim yang menginduksi kinerja gen untuk melakukan sintesis metabolit sekunder.

Pada proses ekastraksi ekstrak kasar menggunakan pelarut etil asetat. Beberapa studi menunjukkan bahwa senyawa antibakteri dapat diekstrak dengan menggunakan berbagai jenis pelarut seperti n-butanol, n-heksan dan etil asetat. Pada penelitian yang dilakukan oleh Sugijanto et al. (2014) metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *Aglaia odorata* dan diekstrak dengan menggunakan etil asetat menunjukkan adanya aktivitas antimikroba terhadap *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Identifikasi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh ketiga isolat bakteri endofit menunjukkan bahwa senyawa tersebut merupakan senyawa dari golongan alkaloid. Alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder pada tanaman yang dapat ditemukan di daun, tunas, akar,

biji buah, dan batang. Oleh karena itu bagian tanaman tersebut pada umumnya digunakan sebagai simplisia yang mengandung alkaloid (Sirait, 2007). Mekanisme senyawa alkaloid sebagai antibakteri didemonstrasikan dengan merusak pembentukan peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan pada dinding sel pada bakteri tidak terbentuk dengan sempurna dan menyebabkan kematian pada sel bakteri (Juliantina, 2008). Selain itu menurut (Gunawan, 2009) senyawa alkaloid mengandung komponen yang jika bereaksi dengan nitrogen pada asam amino dinding sel bakteri dapat menyebabkan perubahan komposisi asam amino sehingga menyebabkan terjadinya perubahan genetik pada rantai DNA bakteri. Kondisi ini akan menyebabkan terjadinya lisis yang berujung pada kematian sel bakteri.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan senyawa metabolit sekunder ketiga isolat bakteri endofit dari tanaman purwoceng mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *E. coli*. Senyawa antibakteri yang dihasilkan ketiga isolat tersebut merupakan senyawa dari golongan alkaloid. Untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan deteksi secara spesifik jenis senyawa metabolit sekunder yang memiliki potensi antibakteri dan kondisi optimum untuk memproduksi senyawa tersebut.

DAFTAR RUJUKAN

- Angelina, M., Turnip, M., & Khotimah, S. (2015). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Protobiont*. 4 (1), 184-189.
- Darwati, I., & Roostika, I. (2006). Status Penelitian Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) di Indonesia. *Buletin Plasma Nutfah*. 12(1), 9-15.
- Endriani, R., Andriani, F., & Alfina, D. (2009). Bakteri Penyebab Infeksi Saluran Kemih (ISK) di Pekanbaru. *JIK Jilid 3* (2), 139-143.
- Firizki, F. (2014). Pola Kepekaan *Escherichia coli* dan *Klebsiella sp.* terhadap Antibiotik Sefalosporin Periode Tahun 2008-2012 di Bandar Lampung. *Medical Journal of Lampung University* 3 (6), 64-73.
- Gunawan, A. W. (2009). *Potensi buah Pare (Momordica charantia L.) sebagai antibakteri Salmonella typhimurium*. Denpasar: Tesis, Universitas Mahasaraswati .
- Juliantina, F. R. (2008). *Manfaat Sirih Merah (Piper crocatum) sebagai Agen Anti Bakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif*. Jakarta: UI-Press.

- Pelczar, M., & Chan, E. C. (1986). *Dasar-Dasar Mikrobiologi (Fundamentals of Microbiology)*. Jakarta: UI-Press.
- Pratiwi, S. T. (2008). *Mikrobiologi Farmasi*. Yogyakarta: Penerbit Erlangga.
- Purwestri, Y. A., Kartikasari, N., Putri, S. G., Wilson, W., & Sembiring, L. (2016). Metabolic Profiling of Endophytic Bacteria from Purwoceng (Pimpinella pruatjan Molkend) Root and Antibacterial Activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *AIP Conf. Proc.* 1744, 020063 (pp. 1-7). AIP Publishing.
- Radji, M. (2005). Peranan Bioteknologi dan Mikrobia Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2(3), 113-126.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Washington DC: Lexi-Comp: American Pharmaceutical Association, Inc.
- Satari, M. H. (2012). Multidrug Resistance (MDR) Bakteri Terhadap Antibiotik. *Prosiding Temu Ilmiah*, (pp. 1-7). Bandung .
- Sirait, M. (2007). *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi*. Bandung: Penerbit ITB.
- Strobel, G. A., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol. and Mol. Biology Rev.* 67(4), 491-502.
- Strobel, G. A., Daisy, B., Castilo, U., & Harper, J. (2004). Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Microbiol. and Mol. Biology Rev.* 67(4), 491-502.
- Sugijanto, N. E., Yodianto, B., Kusumajaya, M. N., & Zaini, N. C. (2014). Aktivitas antimikroba dan analisis KLT-densitometri metabolit fraksi-fraksi ekstrak endofit dari *Aglaia odorata*,. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi.* 3(1), 20-27.
- Syahputra, R. R., Agustina, D., & Wahyudi, S. S. (2018). Pola Kepekaan Bakteri terhadap Antibiotik pada Pasien Infeksi Saluran Kemih di RSD DR. Soebandi Jember. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences* 4 (3), 171-177.
- Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18, 448-459.
- Wardhani, L. K., & Sulistyani, N. (2012). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) terhadap *Shigella flexneri* beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 2(1), 1-16.
- Widayat, T., & Soetarto, A. E. (2012). Isolation of Endophytic Bacteria from Purwoceng (*Pimpinella alpina* Kds.). *Health Science Indones.* 28(1), 31-36.

Wilson, W. (2014). *Bakteri Endofit Tanaman Purwoceng (Pimpinella pruatjan Molk.) berdasarkan Karakter Morfologis, Biokimiawi dan Molekular*. Yogyakarta: Tesis. Program Pascasarjana Fakultas Biologi. UGM.