

**ISOLASI, IDENTIFIKASI DAN UJI ANTI BAKTERI DARI
BAKTERI ENDOFIT PADA CINCAU HIJAU PERDU
(*Premna oblongifolia* Merr)**

SKRIPSI

OLEH :

**AHMAD MAULANA LUBIS
15.870.0027**



**FAKULTAS BIOLOGI
UNIVERSITAS MEDAN AREA
MEDAN
2017**

**ISOLASI, IDENTIFIKASI DAN UJI ANTI BAKTERI DARI
BAKTERI ENDOFIT PADA CINCAU HIJAU PERDU
(*Premna oblongifolia* Merr)**

SKRIPSI

Oleh :

**AHMAD MAULANA LUBIS
15.870.0027**

Skripsi ini sebagai Syarat untuk
Mendapatkan Gelar Sarjana di Fakultas Biologi
Universitas Medan Area

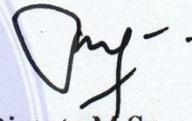
**FAKULTAS BIOLOGI
UNIVERSITAS MEDAN AREA
MEDAN
2017**

Judul Penelitian : Isolasi, Identifikasi Dan Uji Anti Bakteri dari Bakteri Endofit pada Cincau Hijau Perdu (*Premna oblongifolia* Merr)
Nama : Ahmad Maulana Lubis
NPM : 158700027
Fakultas : Biologi

Disetujui Oleh
Komisi Pembimbing :



Ir. E. Harso Kardhinata, M.Sc
Pembimbing I



Drs. Riyanto M.Sc
Pembimbing II




Dr. Mufti Sudiby, M.Si
Dekan


Ferdinand Susilo, S.Si, M.Si
Ka. Prodi/WD I

Tanggal Lulus : 31 Agustus 2017

LEMBAR PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa skripsi yang saya susun, sebagai syarat memperoleh gelar sarjana merupakan hasil karya tulis saya sendiri. Adapun bagian-bagian tertentu dalam tulisan skripsi ini saya kutip dari hasil karya orang lain telah ditulis sumbernya secara jelas sesuai norma, kaidah dan etika penulis ilmiah.

Saya bersedia menerima sanksi pencabutan gelar akademik yang saya peroleh dan sanksi-sanksi lainnya dengan peraturan yang berlaku apabila kemudian hari ditemukan plagiat dalam skripsi ini.

Medan, Januari 2018



Ahmad Maulana Lubis
15.870.0027

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
SKRIPSI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Meda Area, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ahmad Maulana Lubis
NPM : 158700027
Program Studi : Biologi
Fakultas : Biologi
Jenis Karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Medan Area Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-Exklusif Royalti-Free Right*) atas karya ilmiah yang berjudul : Isolasi, Identifikasi Dan Anti Bakteri dari Bakteri Endofit pada Cincau Hijau Perdu (*Premna oblongifolia* Merr).

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Medan Area berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan memublikasikan skripsi saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Medan
Pada tanggal :
Yang menyatakan

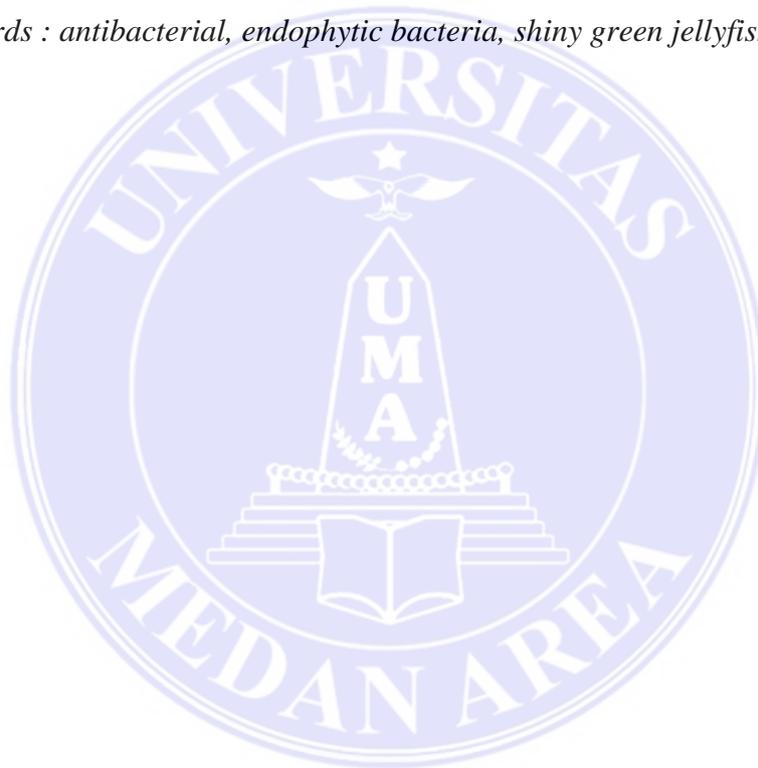


(Ahmad Maulana Lubis)

ABSTRACT

*Endophytic bacteria are microorganisms that are all or part of their lives in plant tissues (stems, branches or branches of plants), in which between them there is a mutually beneficial relationship. Several types of endoid bacteria are known to produce active compounds that are antibacterial. The purpose of this study was to isolate endophytic bacteria from the shoots and roots of green shrubs (*Premna oblongifolia* Merr) which have antibacterial activity against *Escherichia coli* bacteria and identify the bacteria using the identification book of Bergey's Manual Determinative Bacteriology. Isolate endophytic bacteria with potential AB1 code inhibited test bacteria having 9 mm inhibition while AC1 isolates had potential in inhibiting test bacteria with an inhibitory power of 11 mm compared to AC2 isolates having 8 mm inhibition of the test bacteria.*

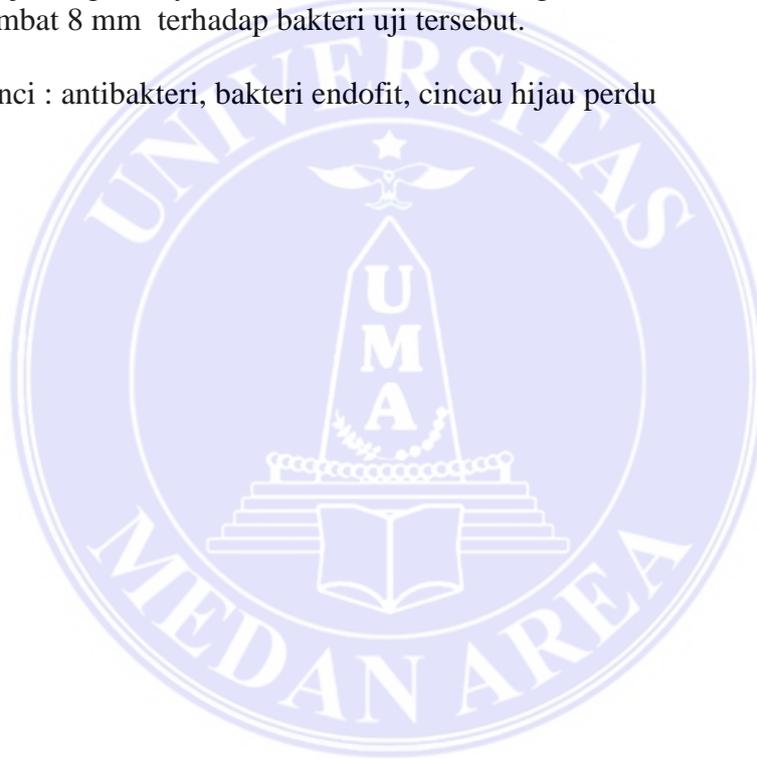
Key words : antibacterial, endophytic bacteria, shiny green jellyfish



ABSTRAK

Bakteri endofit adalah mikroorganisme yang seluruh atau sebagian hidupnya berada dalam jaringan tumbuhan (batang, cabang atau ranting tumbuhan), dimana diantaranya keduanya terjadi hubungan yang saling menguntungkan. Beberapa jenis bakteri endofit diketahui mampu menghasilkan senyawa aktif yang bersifat antibakteri. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi bakteri endofit dari batang dan akar tanaman cincau hijau perdu (*Premna oblongifolia Merr*) yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan mengidentifikasi bakteri tersebut menggunakan buku identifikasi bakteri *Bergey's Manual Determinative Bacteriology*. Isolat bakteri endofit dengan kode AB1 potensial menghambat bakteri uji yang memiliki daya hambat 9 mm sedangkan isolat AC1 mempunyai potensial dalam menghambat bakteri uji dengan daya hambat 11 mm dibandingkan isolat AC2 yang memiliki daya hambat 8 mm terhadap bakteri uji tersebut.

Kata kunci : antibakteri, bakteri endofit, cincau hijau perdu



RIWAYAT HIDUP

Ahmad Maulana Lubis, dilahirkan di Medan pada tanggal 15 Februari 1995 dan merupakan anak ke 1 dari 1 bersaudara, anak dari Ayahanda Nasron Lubis dan Ibunda Nelly Rangkuti.

Pendidikan formal yang di tempuh hingga saat ini adalah :

1. Memasuki Sekolah Dasar Swasta (SDS) Mardliatul Islamiyah 2 pada tahun 2001 dan lulus pada tahun 2007.
2. Memasuki Sekolah Menengah Pertama (SMP) Negeri 1 Batang Kuis pada tahun 2007 dan lulus pada tahun 2010.
3. Memasuki sekolah Menengah Kejuruan (SMK) Darma Analitika pada tahun 2010 dan lulus pada tahun 2013.
4. Memasuki Perguruan Tinggi di Fakultas MIPA Universitas Sutomo Medan pada tahun 2013.
5. Transfer ke Perguruan Tinggi di Fakultas Biologi Universitas Medan Area pada tahun 2015.
6. Mengambil konsentrasi Biologi Industri di Fakultas Biologi Universitas Medan Area pada tahun 2016.
7. Menjadi asisten mata kuliah Kimia Dasar pada tahun ajaran 2016/2017 pada tahun 2017.
8. Melaksanakan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kimia Industri Medan dengan judul : Isolasi, Identifikasi Dan Anti Bakteri dari Bakteri Endofit pada Cincau Hijau Perdu (*Premna oblongifolia* Merr).

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karuniaNya sehingga saya dapat menyelesaikan Skripsi saya. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk dapat menempuh sarjana pada Fakultas Biologi Universitas Medan Area. Skripsi saya ini berjudul : “Isolasi, Identifikasi dan Uji Anti bakteri dari Bakteri Endofit pada Cincau hijau perdu (*Premna oblongifolia* Merr)”.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada orang tua dan keluarga yang selalu memberikan doa serta motivasi dan semangat kepada penulis. Selain itu ucapan terima kasih penulis kepada : Bapak Ir. E Harso Kardhinata M.Sc. selaku pembimbing I dan Bapak Drs. Riyanto M.Sc selaku pembimbing II, serta Ibu Dewi Nur Anggraeni S.Si M.Sc. selaku sekretaris pembimbing yang telah membimbing saya dalam penulisan skripsi saya ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih mempunyai banyak kekurangan karena kemampuan penulis yang masih terbatas. Oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang sifatnya membangun dari semua pihak demi kesempurnaannya skripsi saya ini.

Medan, Oktober 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRACT.....	vi
ABSTRAK.....	vii
RIWAYAT HIDUP.....	viii
KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Cincau Hijau perdu (<i>Premna oblongifolia Merr</i>).....	5
2.2 Karakteristik Tanaman Cincau.....	5
2.2.1 Manfaat Tanaman Cincau.....	7
2.3 Bakteri Endofit.....	8
2.4 Antimikroba.....	10
2.4.1 Definisi.....	10
2.4.2 Aktivitas dan Spektrum.....	11
2.4.3 Mekanisme Kerja.....	11
2.5 Bakteri Uji.....	14
2.4.1 Escherichia coli.....	14
2.6 Metode Pengujian Potensi Senyawa Antimikroba.....	15
2.7 Identifikasi Bakteri.....	17
2.8 Karakterisasi Mikroba.....	18
2.4.1 Karakterisasi Bakteri.....	18

III. METODELOGI PENELITIAN	22
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	22
3.2 Alat dan Bahan	22
3.3 Sampel Penelitian	23
3.4 Metode Penelitian	23
3.5 Sterilisasi Alat dan Media Uji	23
3.6 Prosedur Penelitian	23
3.7 Analisa Data	30
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1 Isolasi Bakteri Endofit Dari Tanaman Cincau Hijau	31
4.2 Identifikasi isolat bakteri endofit dari tanaman cincau hijau	32
4.3 Uji aktivitas antibakteri endofit terhadap E.coli	36
V. SIMPULAN DAN SARAN	41
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42

DAFTAR TABEL

No.	Judul	Halaman
1.	Pewarnaan Gram.....	19
2.	Hasil Isolasi Bakteri endofit.....	32
3.	Deskripsi Bentuk dan Warna koloni.....	32
4.	Hasil Pengamatan Bakteri Berdasarkan Pewarnaan	33
5.	Hasil Identifikasi Bakteri endofit	33
6.	Diameter Zona Hambat Pada Uji Antibakteri.....	36



DAFTAR GAMBAR

No.	Judul	Halaman
1.	Tanaman Cincau Hijau Perdu.....	7
2.	Isolat BC1	34
3.	Bakteri dari Famili <i>Rhodobacteriaceae</i>	35
4.	Bakteri Genus <i>Sphingomonas</i>	36
5.	Zona Hambat Isolat terhadap bakteri <i>Esherichia.coli</i>	40



DAFTAR LAMPIRAN

No.	Halaman
Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian	46
Lampiran 2. Diameter Zona Hambat	47
Lampiran 3. Uji Biokimia	48
Lampiran 4. Alat-alat Penelitian	49
Lampiran 5. Tabel Hasil Identifikasi Bakteri endofit	50



I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tanaman merupakan salah satu sumber daya yang sangat penting dalam upaya pengobatan dan upaya mempertahankan kesehatan pada masyarakat. Masyarakat masih sering menggunakan pengobatan tradisional yang berasal dari tanaman obat. Indonesia dikenal sebagai salah satu negara yang mempunyai keanekaragaman hayati yang tinggi, maka dari nilai potensial untuk mengembangkan obat herbal yang berasal dari tanaman obat sangat besar. Sudah banyak tanaman yang digunakan untuk bahan baku obat, karena tanaman tersebut menghasilkan metabolit sekunder dengan aktivitas biologis yang beraneka ragam, serta mempunyai potensi besar untuk digunakan dan dikembangkan menjadi obat untuk penyakit, seperti contohnya pada tanaman cincau.

Pada tanaman terdapat mikroorganisme yang dapat memproduksi berbagai metabolit sekunder yang mempunyai kemampuan sebagai antibakteri. Sumber daya mikroorganisme yang terdapat didalam jaringan tanaman mulai dikenal dengan sebutan bakteri endofit. Bakteri endofit adalah mikroorganisme yang seluruh atau sebagian hidupnya berada dalam jaringan tumbuhan (batang, cabang atau ranting tumbuhan), dimana diantara keduanya terjalin hubungan yang saling menguntungkan (Kumala dkk, 2006). Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa bakteri endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder. Kemampuan bakteri endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya, merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit

sekunder dari bakteri endofit yang diisolasi dari tanaman tersebut (Radji, 2005). Maka, apabila endofit yang diisolasi dari suatu tanaman dapat menghasilkan metabolit sekunder sama dengan tanaman aslinya atau bahkan dalam jumlah yang lebih tinggi, maka kita tidak perlu menebang tanaman aslinya untuk diambil sebagai simplisia, yang kemungkinan memerlukan waktu yang relatif lama untuk dipanen (Radji, 2005).

Salah satu tanaman yang dapat dijadikan sumber bakteri endofit adalah tanaman cincau hijau perdu. tanaman cincau termasuk tanaman asli Indonesia dan mempunyai nama lain diantaranya Camcao. Juju. kepleng (Jawa): Camcauh. Tahulu (sunda). Ada empat jenis tanaman cincau yaitu cincau hijau baik jenis cincau hijau rambat (*Cyclea barbata* L.Miers) maupun cincau hijau perdu (*Premna oblongifolia*), cincau perdu (*Premna serratifolia*), cincau hitam (*Mesona palustris*) dan cincau minyak (*Stephania hermandifolia*).

Tanaman cincau hijau tersebut di manfaatkan untuk mengobati berbagai macam penyakit yaitu radang lambung dan tekanan darah tinggi. Sedangkan pada akar cincau mengandung pati, lemak dan *alkaloid*. *Cyclein* yang rasanya pahit di manfaatkan untuk mengobati penyakit demam dan sakit perut dan menurut Sunanto, 1995. Daun cincau hijau mampu mematikan empat jenis sel kanker, yaitu sel kanker darah (leukemia), kanker mulut rahim, paru dan payudara. Hal ini dikarenakan cincau mengandung senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan yang mampu mematikan sel kanker.

Cincau hijau perdu (*Premna oblongifolia* Merr), merupakan bahan makan tradisional yang telah lama dikenal masyarakat dan digunakan sebagai minuman segar. Cincau tersebut disenangi masyarakat karena berasa khas, segar, dingin,

serta harganya murah. Menurut Kurnia (2007), bahwa cincau hijau kaya akan karbohidrat, polifenol, flavonoid, saponin, dan lemak, tidak ketinggalan kalsium, fosfor, vitamin A, dan vitamin B. Kandungan polifenol dan flavonoid yang terkandung dalam daun cincau dapat berfungsi sebagai antioksidan. Antioksidan dapat memerangi radikal bebas dalam tubuh. Salah satu penyebab timbulnya radikal bebas adalah konsumsi zat aditif makanan.

Selain itu akar cincau hijau mempunyai khasiat sebagai antimalaria dan mempunyai aktivitas sitotoksik karena adanya kandungan *bisbenzyl isoquinoline* (Angerhofer *et al.*,1999). Tanaman cincau hijau juga dimanfaatkan sebagai makanan bagi yang sedang melakukan diet karena nilai kalorinya yang rendah.

Sumber daya mikroba yang terdapat di dalam jaringan tanaman mulai banyak mendapat perhatian yang dikenal dengan sebutan bakteri endofit. Hal ini merupakan salah satu alternatif pengendalian non kimiawi yang terus dikembangkan dalam beberapa dekade terakhir. Bakteri endofit hidup bersimbiosis dengan tanaman di dalam jaringan tanaman, apabila mikroba tersebut mampu menghasilkan suatu agen biologis yang dapat memerangi penyakit tanaman maka secara langsung tanaman akan terhindar dari penyakit yang juga disebabkan oleh mikroba lain (Melliawati *et al.*, 2006). Hallman dan Berg, (2006) menyebutkan bahwa keunggulan bakteri endofit sebagai agens pengendali hayati, beberapa diantaranya juga mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman yang dikenal dengan *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR), karena mampu meningkatkan ketersediaan nutrisi, menghasilkan hormon pertumbuhan serta dapat menginduksi ketahanan tanaman yang dikenal dengan *Induced Systemic Resistance* (ISR). Tujuan penelitian ini adalah untuk

mengetahui jenis-jenis bakteri endofit dari batang dan akar tanaman cincau hijau perdu (*Premna oblongifolia*).

1.2. Perumusan Masalah

Hal ini memunculkan permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah ada atau tidak bakteri endofit pada batang dan akar tanaman cincau hijau perdu
2. Jika ada, berapakah jumlah jenis dari bakteri endofit yang ada di batang dan akar tanaman cincau hijau perdu
3. Apakah bakteri endofit yang ditemukan memiliki daya antibakteri.

1.3. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui ada atau tidak bakteri endofit pada batang dan akar tanaman cincau hijau perdu
2. Untuk mengetahui jenis-jenis bakteri endofit dari batang dan akar tanaman cincau hijau perdu
3. Untuk mengetahui uji antibakteri dari bakteri endofit yang ditemukan.

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang jenis jenis bakteri endofit yang diisolasi dari batang dan akar tanaman cincau, dan penelitian ini diharapkan dapat menemukan isolat bakteri endofit dalam rangka penemuan obat baru dimasa yang akan datang.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Cincau Hijau perdu

Cincau perdu sering disebut dengan cincau hijau pohon. Jenis cincau perdu ini tidak memanjat seperti cincau hijau merambat, tetapi merupakan tanaman perdu yang dapat bercabang banyak sehingga jika pertumbuhannya baik dan tidak kekurangan air maka tanaman ini sangat rimbun. Cincau perdu dapat tumbuh baik di daerah yang ketinggian 50-1000 meter di atas permukaan laut dengan kondisi tidak kekurangan air (Sunanto, 1995).

Cincau perdu tingginya dapat mencapai 0,5 – 4 m dan cabangnya yang muda bersisik. Daunnya bertangkai saling berhadapan, berbentuk memanjang atau bulat-telur memanjang dengan ujung runcing, dan bertulang daun tiga. Kedua belah sisi daun agak berbulu.

Bunganya terletak pada ujung batang dan ketiak daun yang tertinggi. Tabung kelopak bunga berbentuk lonceng dan bersisik. Benang sari berjumlah 10, bentuknya memanjang dari penghubung sari di bawah ruang sari. Buah bumi berbentuk periuk, membuka melintang secara tak teratur, dan bijinya berbentuk kerang.

2.2. Karakteristik Tanaman Cincau

Tanaman cincau di Indonesia lebih dikenal sebagai minuman tradisional yang menyegarkan, terdapat empat jenis tanaman cincau : cincau hijau (*Cyclea barbata*), cincau perdu (*Premna oblongifolia*), cincau hitam (*Mesona palustris*) dan cincau minyak (*Stephania hermandifolia*), (Lemmens dan Bunyapraphatsara,

2003). Tanaman cincau terbagi menjadi tiga family yaitu menispermaceae, Verbenaceae dan Lamiaceae.

Cincau hijau, dan cincau minyak merupakan tanaman dari famili menispermaceae. Tanaman dari famili ini sangat mudah ditemukan dan dalam perawatannya tergolong sangat mudah, dapat tumbuh secara liar di hutan dan dapat tumbuh di halaman dekat pagar, tergolong tanaman merambat dengan panjang hingga 2,5 m atau lebih dan menyukai sinar matahari (Setiawan, 2008).

Batang dari cincau hijau kira-kira hanya berdiameter 1-3cm, dengan kulit batang yang kasap. Daun merupakan daun tunggal, tersebar, berbentuk perisai dengan ujung yang lancip dan pangkal yang berlekuk (Supriadi, 2001).

Tanaman dari Famili Verbenaceae genus Premna merupakan tanaman perdu yang memiliki tinggi sampai 8 m. Duduk daun berhadapan, bertangkai, tepi daun rata, permukaan daun tipis (Steenis, 2005). Contoh tanaman dari famili Verbenaceae adalah cincau perdu. Cincau perdu merupakan salah satu tanaman cincau yang tidak merambat dan hidup pada daerah yang memiliki ketinggian 50-1000 mdpl. Cincau perdu dapat digunakan sebagai obat, pencuci mulut dan minuman ringan yang sehat (Mardiah, 2007).

Tanaman cincau hitam termasuk Famili Lamiaceae merupakan tanaman yang dapat tumbuh pada ketinggian 150-1800 m diatas permukaan laut. Batangnya beruas, berbulu halus. Daun tanaman cincau hitam berwarna hijau, lonjong, tipis lemas, ujungnya lancip, pangkal hingga tepi daun bergerigi, dan memiliki bulu halus. Panjang daun sekitar 10 cm dan bertangkai sekitar 2 cm. Letak daun saling berhadapan dan berselang seling dengan daun berikutnya (Pitojo dan Zumiyati, 2005)



Gambar 1 : Tanaman Cincau Hijau Perdu (Sumber : [www. Plantamor.com](http://www.Plantamor.com))

2.2.1 Manfaat Tanaman cincau

Tanaman cincau bermanfaat sebagai bahan makanan maupun obat-obatan tetapi tidak semua bagian tanaman dapat digunakan, hanya daun yang dapat digunakan karena pada daun mengandung komponen utama pembentuk gel yaitu polisakarida pektin (Nurdin dkk, 2008).

Lima jenis tanaman cincau berasal dari tiga famili yang berbeda. Gel yang dihasilkan dari daunnya digunakan untuk minuman penyegar. Tanaman ini dapat digunakan sebagai obat radang lambung, menghilangkan rasa mual dan menurunkan darah tinggi. Suatu bahan makanan dikatakan sehat jika didalamnya terdapat bahan-bahan yang diperlukan oleh tubuh, seperti halnya cincau perdu mengandung kalori, protein, lemak, hidrat arang, kalsium, fosfor, besi, vitamin A, B1,C, selain itu terdapat komponen bahan aktif seperti karotenoid, flavonoid, klorofil. Cincau juga dapat digunakan sebagai obat panas dalam, disentri, sariawan, radang usus, keputihan (Mardiah, 2007). Cincau tidak hanya digunakan sebagai obat, beberapa penelitian membuktikan bahwa ekstrak daun cincau

memiliki kapasitas antioksidan dan antibakteri sehingga aman dikonsumsi (Nurdin dkk, 2008).

2.3. Bakteri Endofit

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman pada periode dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya (Radji, 2005). bakteri endofit tumbuh di jaringan vaskular dari tanaman inangnya (Stone *et al*, 2000). Jaringan vaskular (pembuluh) terdapat diseluruh tubuh tanaman, mengangkut zat-zat antara akar dan tunas (Campbell, Reece, Mitchell, 2002). Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat transfer genetik (genetic recombination) dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit (Tan & zou, 2001).

Kemampuan bakteri endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya tersebut (Radji, 2005). Dari sekitar 300.000 jenis tanaman yang tersebar di muka bumi ini, masing-masing tanaman mengandung satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri atau fungi (Strobel & Daisy, 2003), sehingga apabila endofit yang diisolasi dari satu tanaman obat dapat menghasilkan metabolit sekunder sama dengan tanaman aslinya atau bahkan dalam jumlah yang lebih tinggi, maka kita tidak perlu menebang tanaman aslinya untuk diambil sebagai simplisia, yang kemungkinan memerlukan waktu yang relatif lama untuk dipanen (Radji, 2005).

Bakteri endofit meningkatkan adaptasi ekologi inangnya dengan menaikkan toleransi mereka pada “stress” lingkungan (lingkungan yang kurang menguntungkan) dan juga menaikkan resistensi inangnya terhadap fitopatogen dan atau herbivora termasuk serangga yang memakan tanaman inang. Bakteri endofit juga dapat melindungi inangnya dari serangan bakteri atau fungi patogen dari lingkungan disekitarnya (Tan & zou, 2001).

Berbagai jenis bakteri endofit telah berhasil diisolasi dari tanaman inangnya, dan telah berhasil dibiakkan dalam medium pembenihan yang sesuai. Demikian pula metabolit sekunder yang diproduksi oleh bakteri endofit tersebut dapat diisolasi dan dimurnikan serta dielusidasi struktur molekulnya (Radji, 2005).

Beberapa penelitian terkait dengan bakteri endofit yang berpotensi sebagai antibiotik telah dilakukan. *Cryptocandin* adalah antifungi yang dihasilkan oleh mikroba endofit *Cryptosporiopsis quercina* yang berhasil diisolasi dari tanaman obat *Tripterigeum wilfordii*, dan berkhasiat sebagai antifungi yang patogen terhadap manusia yaitu *Candida albicans* dan *Trichopyton sp.* (Strobel, Miller, Condron, Teplow, & Hess. 1999). Phomopsialhalasin merupakan metabolit yang diisolasi dari bakteri endofit *Phomopsis sp.*, berkhasiat sebagai antimikrob *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* dan dapat juga menghambat pertumbuhan fungi *Candida tropicalis* (Horn, Simmonds, Schartz, & Blaney, 1995). Antibiotik berspektrum luas yang disebut munumbicin dihasilkan oleh endofit *Streptomyces sp.* Strain NRRL 30562 yang merupakan endofit yang diisolasi dari tanaman *Kennedia nigricans*, dapat menghambat pertumbuhan

Bacillus anthracis dan *Mycobacterium tuberculosis* yang multiresisten terhadap berbagai obat anti TBC (Castillo *et al*, 2002).

Ditinjau dari hubungan tersebut, bakteri endofit berpotensi untuk digunakan pada pengobatan modern, pertanian dan industri, fungi dan bakteri adalah mikroba yang paling umum membentuk koloni pada jaringan tanaman, yang selanjutnya disebut mikroba endofit (Strobel & Daisy, 2003). Endofit umumnya tidak ditemukan pada organ yang spesifik tetapi kebanyakan spesies mikroba endofit diisolasi dari batang dan juga dari daun.

Untuk mengidentifikasi suatu jenis mikroba perlu dilakukan isolasi untuk memperoleh biakan murni. Setiap koloni yang berlainan mewakili macam bakteri yang berbeda sehingga hal ini dapat digunakan untuk melakukan isolasi suatu mikroba. Untuk mengisolasi mikroba dibawah kondisi laboratorium perlu disediakan nutrien dan kondisi fisik yang akan memenuhi persyaratan tipe bakteri tertentu yang sedang ditelaah, sejalan dengan hal tersebut, berbagai macam medium digunakan didalam mikrobiologi, dikombinasikan dengan berbagai kondisi fisik untuk inkubasi (Pelczar & Chan, 1986).

2.4. Antimikroba

2.4.1. Definisi

Antimikroba merupakan suatu produk obat pembasmi mikroba, khususnya mikroba yang merugikan manusia. Menurut Tortora *et al*. (2001), antimikroba adalah suatu produk atau bahan metabolit yang diperoleh dari atau dibentuk oleh berbagai spesies mikroorganisme lainnya. Antimikroba tersebar di alam dan memegang peranan penting dalam mengatur populasi mikroba dalam tanah, air, limbah dan kompos. Antimikroba ini berbeda dalam susunan kimia dan cara

kerjanya. Dari sekian banyak antimikroba yang telah berhasil ditemukan, hanya beberapa saja yang cukup tidak toksik untuk dapat dipakai dalam pengobatan. Antimikroba yang kini banyak digunakan, kebanyakan diperoleh dari genus *Bacillus*, *Penicillium* dan *Streptomyces* (Tortora *et al.*, 2001).

2.4.2. Aktivitas dan Spektrum

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antimikroba yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakteriostatik dan ada yang bersifat membunuh mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakterisidal. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM). Antimikroba tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari bakteriostatik menjadi bakterisidal bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi KHM.

Berdasarkan spektrum kerjanya, antimikroba dibagi menjadi dua kelompok, yaitu berspektrum sempit (benzyl penisilin dan streptomisin) dan berspektrum luas (tetrasiklin dan kloramfenikol) (Gunawan, 2011).

2.4.3. Mekanisme Kerja

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok (Gunawan, 2011):

1. Antimikroba yang menghambat metabolisme sel mikroba

Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini ialah sulfonamida, trimetoprim, asam p-aminosalisilat (PAS) dan sulfon. Dengan mekanisme kerja ini diperoleh efek bakteriostatik. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Berbeda dengan mamalia yang mendapatkan

asam folat dari luar, kuman patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam amino benzoat (PABA) untuk diikuti sertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional. Akibatnya, pertumbuhan mikroba akan terganggu.

2. Antimikroba yang menghambat sintesis dinding sel mikroba

Dinding sel bakteri terdiri dari peptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Antimikroba ini akan menghambat reaksi yang paling dini dalam proses sintesis dinding sel dan diakhiri dengan menghambat reaksi terakhir (transpeptidasi) dalam rangkaian reaksi tersebut. Oleh karena tekanan osmotik dalam sel kuman akan menyebabkan terjadi lisis, yang merupakan dasar efek bakterisidal pada kuman yang peka. Contoh antimikroba ini adalah penisilin, sefalosporin, basitrasin, vankomisin, dan sikloserin.

3. Antimikroba yang mengganggu ketahanan membran sel mikroba

Antimikroba ini dapat merusak permeabilitas selektif dari membran sel mikroba dengan cara mengubah tegangan permukaan (*surface-active agent*). Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain. Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini yaitu polimiksin, golongan polien serta berbagai antimikroba kemoterapeutik.

4. Antimikroba yang menghambat sintesis protein sel mikroba

Untuk kehidupannya, sel mikroba perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri atas dua sub unit, yang berdasarkan konstanta

sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Untuk berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi kromosom 70S. Penghambat sintesis terjadi dengan berbagai cara. Ada yang berikatan dengan komponen ribosom 30S dan menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein. Akibatnya akan terbentuk protein yang abnormal dengan nonfungsional bagi sel mikroba. Sebagai contoh: streptomisin dan tetrasiklin. Ada juga yang berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida. Akibatnya, rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena lokasi asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru. Sebagai contoh: eritromisin, linkomisin, dan kloramfenikol.

5. Antimikroba yang menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba

Antimikroba ini berikatan dengan enzim polymerase-RNA (pada sub unit) sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Golongan kuinolon menghambat enzim DNA girase pada kuman yang fungsinya menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga dapat masuk ke dalam sel kuman yang kecil. Contoh antimikroba kelompok ini ialah rifampisin dan golongan kuinolon.

2.5. Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli*.

2.5.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli pertama kali diidentifikasi oleh dokter hewan Theodor Escherich dalam studinya mengenai sistem pencernaan pada bayi hewan. Pada 1885, beliau menggambarkan organisme ini sebagai komunitas bakteri *coli*. Nama “*Bacterium coli*” sering digunakan sampai pada tahun 1991. Ketika Castellani dan Chalames menemukan genus *Escherichia* dan menyusup tipe spesies *Escherichia coli* (Jawetz, 2005). *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif bersifat anaerob fakultatif, berbentuk batang pendek, motil aktif dan tidak membentuk spora. Klasifikasi Taksonomi (Brooks *et al*, 2007), bakteri *Escherichia coli* termasuk kedalam Kingdom *Bacteria*, Filum *Proteobacteria*, Kelas *Gamma Proteobacteria*, Ordo *Enterobacteriales*, Famili *Enterobacteriaceae*, Genus *Escherichia*, Spesies *Escherichia coli*.

Escherichia coli mempunyai beberapa antigen, yaitu antigen O (polisakarida), antigen K (kapsular), antigen H (flagella). Antigen O merupakan antigen somatik berada dibagian terluar dinding sel lipopolisakarida dan terdiri dari unit berulang polisakarida. Antibodi terhadap antigen O adalah IgM. Antigen K adalah antigen polisakarida yang terletak di kapsul (Juliantina *et al.*, 2008).

Escherichia coli terdapat di saluran pencernaan manusia dan binatang, dapat pula ditemukan di sungai, danau, tanah, dan tempat lain yang telah terkontaminasi feses. *Escherichia coli* dapat menyebabkan infeksi primer pada usus misalnya diare. Namun sebagai bagian dari flora normal saluran pencernaan, *Escherichia coli* berperan penting untuk pencernaan makanan dengan

memproduksi vitamin K dari materi-materi yang tidak tercernakan di usus besar. Selnya berukuran antara 0,4-0,7 μm x 1,4 μm (Syahrurachman *et al*, 1994).

2.6. Metode Pengujian Potensi Senyawa Antimikroba

Potensi antimikroba dapat ditetapkan dengan berbagai cara antara lain :

1. Metode Difusi

Cara ini berdasarkan kemampuan obat untuk berdifusi dalam medium tempat mikroba dapat berkembang biak secara optimal. Disk antibiotik diletakkan di atas agar atau bila dengan metode sumuran antibiotik dimasukkan dalam sumuran. Besarnya daerah difusi tergantung dengan daerah pertumbuhan atau hambatan mikroba uji dan sebanding dengan kadar obat yang diberikan. Pada pelaksanaannya, metode difusi ada beberapa cara, yaitu:

a. Cara Kirby Bower

Cara ini dilakukan dengan cara menggosokkan suspensi mikroba tertentu, umumnya 10^6 Colony Forming Unit (CFU) per-ml pada permukaan medium hingga merata. Kertas disk yang mengandung antibiotik diletakkan di atas medium lalu diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam, setelah itu dibaca hasilnya. Cara ini dikenal 2 macam zona, yaitu:

- 1). Zona radikal adalah suatu daerah di sekitar disk yang sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan mikroab.
- 2). Zona irradikal adalah suatu daerah disekitar disk yang menunjukkan pertumbuhan mikroba yang dihambat oleh antibiotik tersebut tetapi tidak dimatikan (Hugo & Russel, 1987).

b. Cara paper disc

Cara ini adalah cara yang paling banyak digunakan untuk menentukan kepekaan mikroba terhadap berbagai macam obat-obatan. Cara ini menggunakan cakram kertas saring atau tablet yang mengandung suatu obat dengan kekuatan tertentu yang diletakkan pada lempengan agar yang telah ditanami mikroba yang akan diperiksa. Hambatan akan terlihat sebagai daerah yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan mikroba disekitar cakram. Lebar hambatan ini tergantung pada daya resap obat ke dalam agar dan kepekaan mikroba terhadap obat tersebut.

Hasil dibaca setelah inkubasi selama 18-24 jam. Pada keadaan tertentu mungkin dapat dilakukan pembacaan pendahuluan setelah inkubasi selama 6-8 jam, untuk menguatkan kemudian diulang setelah 18-24 jam. Daerah hambatan diukur dalam satuan milimeter, dengan mengukur seluruh garis tengah hambatan dan cakram (Bonang & Koeswardono, 1982).

c. Cara sumuran

Penyiapan dilakukan seperti cara *kirby Bower*. Setelah biakan siap, dibuat sumuran dengan diameter tertentu dan tegak lurus terhadap permukaan agar, ke dalam sumuran ditetaskan larutan uji lalu diinkubasi selama 24 jam 37⁰C, setelah itu hasilnya dibaca seperti cara *kirby bower* (Hugo & Russel, 1987).

2. Metode dilusi

Metode ini menggunakan senyawa anti mikroba dengan kadar menurun secara bertahap, baik dengan medium cair atau padat. Kemudian medium diinokulasikan mikrobia uji dan diinkubasi. Tahap akhir dilarutkan senyawa antimikroba dengan kadar yang menghambat atau mematikan. Pada uji kepekaan cara dilusi agar memakan waktu dan penggunaannya dibatasi pada keadaan tertentu

saja. Uji kepekaan cara dilusi cair dengan menggunakan tabung reaksi, tidak praktis dan jarang dipakai, namun kini ada cara yang sederhana dan banyak dipakai yakni menggunakan *microdilution plate*. Keuntungan mikrodilusi cair adalah bahwa uji ini memberi hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan mikroba uji (Jawetz *et al*, 2001).

2.7. Identifikasi Bakteri

Untuk identifikasi dan determinasi suatu biakan murni suatu bakteri hasil isolasi perlu ditentukan morfologi sel individual, morfologi koloni, dan sifat-sifat biokimianya (fisiologi).

Pada identifikasi bakteri mula-mula diamati morfologi individual secara mikroskopik dan pertumbuhannya pada berbagai medium. Karena suatu bakteri tidak dapat dideterminasi hanya berdasar sifat-sifat morfologinya saja, maka perlu diteliti pula sifat-sifat biokimia dan faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhannya. Mikroba yang morfologinya sama mungkin berbeda dalam kebutuhan nutrisi serta persyaratan ekologi lainnya (temperatur, pH, dan sebagainya). Patogenesis mikroba patogen dapat dipakai untuk membantu identifikasi dan determinasi bakteri tersebut. Apabila suatu bakteri memiliki sifat yang hampir sama (terutama yang patogen), maka perlu diselidiki sifat ekologinya (Jutono dkk, 1980).

2.8. Karakterisasi Mikroba

2.8.1. Karakterisasi Bakteri

2.8.1.1. Teknik pewarnaan (Pelczar, 1986)

Banyak senyawa organik berwarna (zat pewarna) digunakan untuk mewarnai mikroorganisme untuk pemeriksaan mikroskopis. Telah dikembangkan prosedur-prosedur pewarnaan untuk:

1. Mengamati dengan lebih baik bentuk morfologi mikroorganisme secara kasar.
2. Mengidentifikasi bagian-bagian struktural sel mikroorganisme.
3. Membantu mengidentifikasi dan/atau membedakan organisme yang serupa.

Langkah-langkah utama dalam mempersiapkan spesimen mikroba yang diwarnai untuk pemeriksaan mikroskopis ialah:

1. Penempatan olesan, atau lapisan tipis spesimen, pada kaca objek.
2. Fiksasi olesan itu pada kaca objek, biasanya dengan pemanasan, menyebabkan mikroorganisme itu melekat pada kaca objek.
3. Aplikasi pewarna tunggal (pewarnaan sederhana) atau serangkaian larutan pewarna atau reagen (pewarnaan diferensial).

Pewarnaan sederhana. Pemberian warna pada bakteri atau jasad-jasad renik lain dengan menggunakan larutan tunggal suatu pewarna pada lapisan tipis, atau olesan, yang sudah difiksasi, dinamakan pewarnaan sederhana.

Pewarnaan diferensial. Prosedur pewarnaan yang menampilkan perbedaan di antara sel-sel mikroba atau bagian-bagian sel mikroba. Dengan teknik ini biasanya digunakan lebih dari satu larutan zat pewarna atau reagen pewarnaan.

Pewarnaan Gram. Salah satu teknik pewarnaan diferensial yang paling penting dan paling luas digunakan untuk bakteri ialah pewarnaan Gram. Dalam proses ini olesan bakteri yang terfiksasi dikenai larutan-larutan berikut yaitu ungu kristal, lugol, alkohol 96% (bahan pemucat), dan safranin atau beberapa pewarna tandingan lain yang sesuai. Bakteri diwarnai dengan metode Gram ini dibagi menjadi dua kelompok. Salah satu di antaranya, bakteri Gram positif, mempertahankan zat pewarna ungu kristal dan karenanya tampak ungu tua. Kelompok yang lain, bakteri Gram negatif, kehilangan ungu kristal ketika dicuci dengan alkohol, dan sewaktu diberi pewarna tandingan dengan warna merah safranin, tampak berwarna merah. Hal ini tampaknya disebabkan oleh perbedaan dalam struktur kimiawi permukaannya. Langkah-langkah dalam prosedur serta hasil-hasilnya pada setiap tahap dirangkumkan pada tabel berikut.

Tabel 1. pewarnaan Gram (Pelczar, 1986)

No.	Larutan dan urutan penggunaannya	Reaksi dan Tampang Bakteri	
		Gram Positif	Gram Negatif
1.	Ungu kristal (uk)	Sel berwarna ungu	Sel berwarna ungu
2.	Lugol (Y)	Kompleks UK-Y terbentuk di dalam sel; sel tetap berwarna ungu	Kompleks UK-Y terbentuk di dalam sel; sel tetap berwarna ungu
3.	Alkohol 96%	Dinding sel mengalami dehidrasi, pori-pori menciut; daya rembes dinding sel dan membran menurun, komplrk UK-Y tak dapat ke luar dari sel; sel tetap ungu	Lipid terekstaksi dari dinding sel, pori-pori mengembang, kompleks UK-Y keluar dari sel; sel menjadi tak berwarna
4.	Safranin	Sel tek terpengaruhi, tetap ungu	Sel menyerap zat pewarna ini, menjadi merah

Untuk determinasi bakteri digunakan buku panduan buku determinasi oleh Holt *et al* (2000), yang memuat sifat-sifat bakteri yang telah dikenal.

1. Sifat Morfologi

a. Morfologi sel individual, meliputi :

- 1). Ukuran, bentuk, dan rangkaian sel.
- 2). Ada tidaknya spora dan kedudukan spora.
- 3). Ada tidaknya flagella, kedudukan dan jumlah flagella.
- 4). Ada tidaknya kapsul.
- 5). Reaksi-reaksi pengecatan.

b. Morfologi koloni, meliputi : pertumbuhan, bentuk, ukuran, tekstur, bau, konsistensi, kilat dan ciri-ciri optik dari isolat koloni bakteri pada beberapa tipe medium yaitu medium agar miring, tegak dan cair. Pada medium agar miring koloni bakteri diinokulasikan sepanjang agar secara goresan dengan ose, pada medium agar tegak koloni bakteri diinokulasikan secara tusukan, dan pada medium cair koloni bakteri diinokulasikan langsung pada medium (Jutono dkk, 1980).

2. Sifat Biokimia

Pengujian sifat biokimia meliputi :

a. Pembentukan asam sulfida (H_2S)

Uji ini bertujuan untuk menunjukkan adanya pembentukan H_2S pada medium TSIA (Triple Sugar Iron Agar) (Jutono dkk, 1980).

b. Uji Sitrat

Uji sitrat digunakan untuk melihat mikroba menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Digunakan medium Simmon sitrat berupa medium padat.

c. Uji katalase

Katalase adalah enzim yang mengkatalisasikan penguraian hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan O_2 . Pada bakteri yang bersifat katalase-positif terlihat pembentukan gelembung udara sekitar koloni.

d. Uji pencairan gelatin

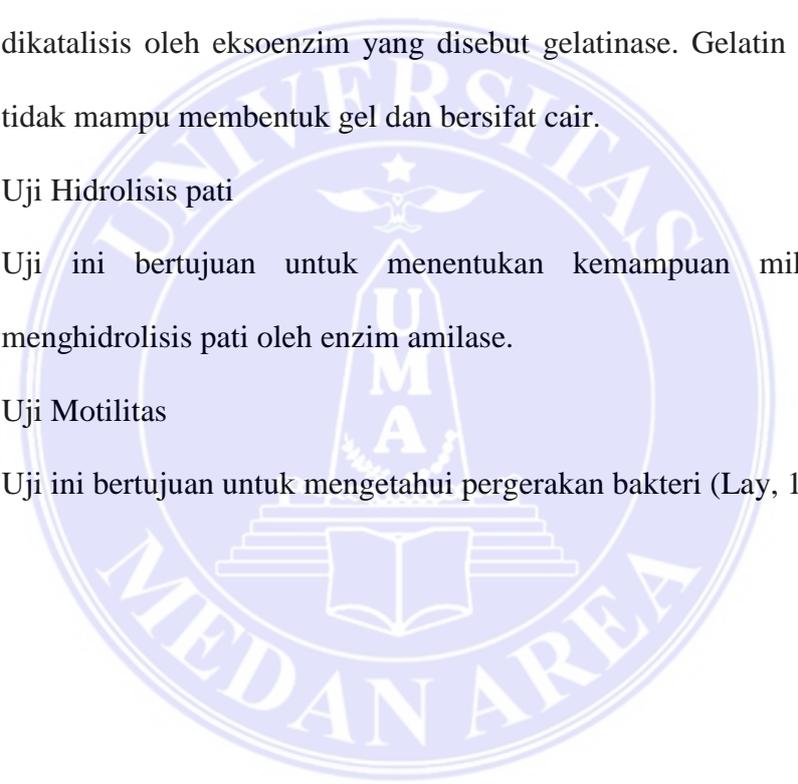
Gelatin adalah protein yang diperoleh dari tulang, tulang rawan atau tenunan ikat hewani lainnya. Hidrolisis gelatin oleh mikroba tersebut dikatalisis oleh eksoenzim yang disebut gelatinase. Gelatin yang dicerna tidak mampu membentuk gel dan bersifat cair.

e. Uji Hidrolisis pati

Uji ini bertujuan untuk menentukan kemampuan mikroba untuk menghidrolisis pati oleh enzim amilase.

f. Uji Motilitas

Uji ini bertujuan untuk mengetahui pergerakan bakteri (Lay, 1994).



III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2016 sampai Februari 2017, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kimia Industri Medan.

3.2 Alat Dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Cawan Petri, tabung reaksi, labu Erlenmeyer, *beaker glass*, gelas ukur, *cover glass*, kaca obyek, pipet tetes, spatula, gunting bedah, pisau bedah, pinset, jarum ose, tissue steril, kertas saring, kertas perkamen, pH indikator, *plastic wrap*, *aluminium foil*, dan tip (Bio Rad), timbangan analitik, inkubator, autoklaf, oven, *hot plate*, mikroskop cahaya (Olympus) dengan mikroskop electron, dan alat-alat gelas lain yang bisa digunakan di laboratorium mikrobiologi.

Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan batang tanaman cincau, alkohol 70%, natrium hipoklorit (NaOCl) 3%, akuades steril, media *Nutrient Agar*, media *Nutrient Broth*, hidrogen peroksida (uji katalase), media *Triple Sugar Iron Agar* (uji fermentasi laktosa), media sulfite indol motility (uji motilitas/pergerakan bakteri), media gelatin (uji hidrolisa gelatin), media starch agar (uji hidrolisa pati), media *Simmon's Citrate Agar* (uji sitrat), reagen pewarnaan (kristal violet, lugol, safranin, aseton alkohol), dan spiritus.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah batang dan akar tanaman cincau hijau (*Premna oblongifolia* Merr), diperoleh dari Desa Bandar Khalifah yang terdapat dua tempat yang sama, Di Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara. Sampel diambil dengan menggunakan *cutter* dan segera dimasukkan ke dalam kantong plastik steril untuk kemudian dibawa ke laboratorium mikrobiologi.

3.4 Metode Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental murni dan bersifat eksploratif-deskriptif.

3.5 Sterilisasi Alat dan Media Uji

Seluruh alat yang tahan panas disterilkan di dalam oven dengan suhu 180°C selama 2 jam. Sedangkan media dan bahan yang tidak tahan panas disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C tekanan 2 atm.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1. Pembuatan Media nutrient agar (NA)

Media *Nutrient Agar* (NA) *plate* dibuat untuk isolasi dan pemurnian bakteri endofit, serta peremajaan bakteri uji. Media ini dibuat dengan cara *Nutrient Agar* (NA) ditimbang sebanyak 20 gram dan dilarutkan dalam akuades hingga 1 volume mencapai liter. Larutan kemudian dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen. Media disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C. Media yang sudah steril disimpan di kulkas agar tidak terjadi kontaminasi dan dapat digunakan selanjutnya.

3.6.2. Isolasi Bakteri Endofit

Pada proses isolasi diharapkan pemilihan fase pertumbuhan tanaman yang baik sebagai sumber isolat bakteri endofit karena pertimbangan kemudahan pada batang dan perakarannya yang masih muda atau tidak keras (lunak) sehingga mudah dalam penggerusan. Tanaman yang digunakan jangan masih muda kali, harus berumur 6 bulan ke atas. Isolasi bakteri endofit dilakukan mengikuti metode sterilisasi permukaan. Kemudian organ batang, daun dan akar apabila dapat, dari tanaman cincau tersebut, dicuci dengan air mengalir dan diletakkan di atas kertas saring steril. Selanjutnya dipotong lebih kurang 1-2 cm. Potongan organ tanaman tersebut disterilisasi dengan alkohol 70% selama lebih kurang 1 menit, lalu dipindahkan atau direndamkn ke Na hipoklorit (Bayclin 3%) selama lebih kurang 1 menit dan kembali disterilkan dengan cara dibilas alkohol 70% sebanyak tiga kali, selanjutnya dibilas lagi dengan akuades steril sebanyak 3 kali (Radji *et al*, 2011).

Kemudian pada potongan batang dibelah, diletakkan di media NA yang mengandung nistatin 100 mg/l. Untuk organ akar terlebih dahulu digerus dengan mortal steril sampai halus, untuk gerusan akar ditambah 10 ml akuades steril, sedangkan untuk daun ditambahkan garam fisiologis sebanyak 100 μ L untuk mempermudah pengambilan ekstrak. Kemudian ditumbuhkan dengan cara disebar pada cawan petri yang berisi NA. Inkubasi dilakukan selama 24-48 jam pada suhu 35 $^{\circ}$ C. Koloni bakteri endofit yang muncul pada media isolasi kemudian dilakukan pemurnian. Pemurnian dilakukan dengan menginokulasi secara bertahap dan berulang pada suhu 35 $^{\circ}$ C (Modifikasi Desriani *et al*, 2013).

3.6.4. Pemurnian Bakteri Endofit

Bakteri yang tumbuh pada media isolasi NA, disubkultur pada media NA dan diinkubasi pada suhu 35⁰C selama 24-48 jam, sampai diperoleh koloni murni. Koloni murni kemudian dipindahkan ke agar miring NA dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 35⁰C. Setiap isolat bakteri endofit dibuat dua pada agar miring NA, masing-masing dipergunakan sebagai *stock culture* (kultur stok) dan *working culture* (kultur kerja),(Nursulistyarini & Ainy, 2013).

3.6.5. Identifikasi Isolat Bakteri Endofit

3.6.5.1. Karakterisasi Pengamatan Bakteri Endofit

1) Pengamatan secara Makroskopis Bakteri Endofit

Karakterisasi pengamatan makroskopis bakteri endofit dilakukan dengan mengamati morfologi dan pertumbuhan koloni. Pengamatan yang dilakukan meliputi bentuk koloni (*whole colony*), bentuk tepi (*edge*), warna (*colour*) dan bentuk permukaan (*elevation*) (Mutmainnah *et al*, 2008).

2) Pengamatan secara Mikroskopis Bakteri Endofit

Karakterisasi pengamatan mikroskopik dilakukan untuk melihat bentuk sel bakteri dan untuk melihat kemurnian dari isolat. Pengamatan mikroskopik meliputi pewarnaan gram, uji katalase. Untuk penentuan genus bakteri dilanjutkan dengan serangkaian uji biokimia terhadap isolat yang diperoleh dengan berpedoman pada buku *Bergey's Manual Determinative Bacteriology*.

3.6.5.2. Pewarnaan Gram

Dibuat preparat ulas isolat bakteri endofit, kemudian difiksasi di atas pembakar spirtus. Diteteskan cat kristal violet dan didiamkan selama 1 menit. Sisa cat dicuci dengan air mengalir lalu ditetesi larutan lugol dan didiamkan selama 1

menit. Dicuci dengan air mengalir dan diberi larutan peluntur alkohol 96% kemudian dicuci dengan air mengalir kemudian tambahkan larutan safranin, didiamkan selama 45 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir, dikering anginkan. Diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dengan menggunakan minyak omersi oil. Jika sel bakteri berwarna ungu berarti isolat bakteri endofit yang diisolasi termasuk gram positif. Tetapi jika sel bakteri berwarna merah berarti isolat bakteri endofit termasuk bakteri gram negatif.

3.6.6. Uji Bakteri Endofit Penghasil Metabolit Antibakteri

3.6.6.1 Persiapan Inokulum Bakteri Endofit Cincin hijau Perdu

Pembuatan inokulum bakteri endofit dibuat dengan menggunakan media Mueller-Hinton Broth (MHB). Masing-masing koloni bakteri endofit yang telah diinkubasi pada media NA selama 24 jam pada suhu 37⁰C, diambil 1 ose dan dipindahkan ke dalam 10 ml media MHB. Media diinkubasi selama 24 jam, suhu 37⁰C. (Elita *et al*, 2013).

3.6.6.2 Produktifitas Metabolit Antibakteri

Produksi metabolit antibakteri oleh bakteri endofit dilakukan dengan cara menanam suspensi bakteri endofit yang sudah dibuat sebelumnya kemudian dipindahkan sebanyak 1 ml ke dalam media MHB pada tabung reaksi, diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 16 dan 18 jam (fase akhir log tiap spesies). Setelah selesai, masing-masing media pertumbuhan didiamkan pada suhu 4⁰C selama 20 menit (Utami, 2011). Kemudian dipergunakan dalam pengujian aktifitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*.

3.6.7 Uji Aktifitas Antibakteri Terhadap *Escherichia coli*.

3.6.7.1 Pembuatan Bakteri uji

Biakan murni bakteri diremajakan pada media agar padat dengan cara bakteri diambil 1 ose lalu jarum ose yang mengandung bakteri *Escherichia coli* digoreskan secara aseptis pada media NA 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 37⁰C dalam inkubator, lalu ambil 1 koloni dan ditanam dalam NaCl 0.9% sampai mencapai kekeruhan 0,5 McFarland (Ngajow *et al*, 2013).

3.6.7 Uji Antibakteri terhadap *Escherichia coli*

Media yang digunakan untuk uji aktifitas antibakteri yaitu media MHA (Mueller Hinton Agar). Uji aktifitas antibakteri bakteri endofit terhadap bakteri *Escherichia coli* 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 6 mm. Secara aseptik, kertas cakram yang sudah disterilkan direndam dalam kultur bakteri endofit selama 60 menit (Simarmata, 2007). Media MHA dituang dalam cawan petri kemudian ditunggu hingga padat, lalu bakteri uji dioleskan menggunakan cotton swab diatas media yang sudah padat. Kertas cakram diambil dengan menggunakan pinset steril dan diletakkan diatas media uji aktifitas antibakteri (Media plat MHA). Kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰C. 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 (Prescolt, 2002).

3.6.8 Uji biokimia

1) Uji pembentukan H₂S

Diinokulasikan kultur isolat bakteri endofit yang mempunyai potensi penghambatan paling kuat dari kultur yang umur 48 jam dengan jarum inokulasi secara tusukan pada medium TSIA miring dan pada permukaan medium diinokulasi secara goresan dengan menggunakan ose. Diinkubasikan selama 48 jam pada suhu 37⁰C. Pengamatan uji H₂S dilakukan dengan cara membandingkan medium yang diinokulasi isolat bakteri endofit terhadap kontrol (tanpa inokulasi bakteri endofit). Pembentukan H₂S ditunjukkan dengan terbentuknya endapan hitam yang berarti bakteri mampu menghasilkan senyawa desulfurase, selain itu dapat digunakan untuk mengamati fermentasi gula. Jika pada bagian bawah medium berwarna kuning sedang bagian atas berwarna merah berarti terjadi fermentasi glukosa. Jika baik pada bagian atas ataupun bawah medium berwarna kuning dan kadangkala disertai pembentukan gas berarti laktosa atau sukrosa atau keduanya difermentasikan. Dan jika seluruh medium berwarna merah berarti ketiga macam gula tidak difermentasikan.

2) Uji sitrat

Diinokulasikan 1 ose kultur isolat bakteri yang mempunyai potensi penghambatan paling kuat dari kultur yang umur 48 jam pada medium *simmon's citrate* secara miring. Diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Pengamatan uji sitrat dilakukan dengan membandingkan medium *simmon's citrate* yang diinokulasikan isolat bakteri endofit terhadap kontrol (tanpa inokulasi bakteri

endofit). Perubahan warna dari hijau menjadi biru menunjukkan bahwa bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon.

3) Uji katalase

Satu ose kultur bakteri endofit yang mempunyai potensi penghambatan paling kuat diletakkan pada gelas benda. Ditambahkan 1 tetes 30% H₂O₂ dan dibandingkan dengan kontrol (tanpa inokulasi bakteri endofit). Jika terjadi gelembung udara berarti bakteri memiliki enzim katalase.

4) Uji hidrolisis gelatin

Diinokulasikan kultur isolat bakteri endofit yang mempunyai potensi penghambatan paling kuat dari kultur yang umur 48 jam secara tusukan pada medium dengan komposisi gelatin 12% dan nutrient broth dengan takaran 13gram/L kemudian diinkubasikan selama 72 jam. Setelah 72 jam, tabung dimasukkan ke dalam lemari es selama 30 menit. Diamati apakah terjadi pencairan gelatin atau tidak dan dibandingkan dengan kontrol (tanpa inokulasi bakteri endofit). Apabila terjadi pencairan gelatin berarti bakteri mampu menghasilkan *eksoenzim gelatinase*.

5) Uji hidrolisa pati

Satu ose kultur isolat bakteri endofit dari biakan lalu digoreskan pada media pati dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 45⁰C. Permukaan koloni ditetesi dengan iodin. Uji positif ditunjukkan dengan adanya zona bening disekeliling koloni.

6) Uji Motilitas

Satu ose kultur isolat bakteri endofit diinokulasikan pada media Sulfid Indol Motility (SIM) dengan cara memasukkannya hingga setengah media pada

tabung reaksi lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 65⁰C. Uji positif ditunjukkan dengan adanya jejak pergerakan bakteri.

3.7. Analisa Data

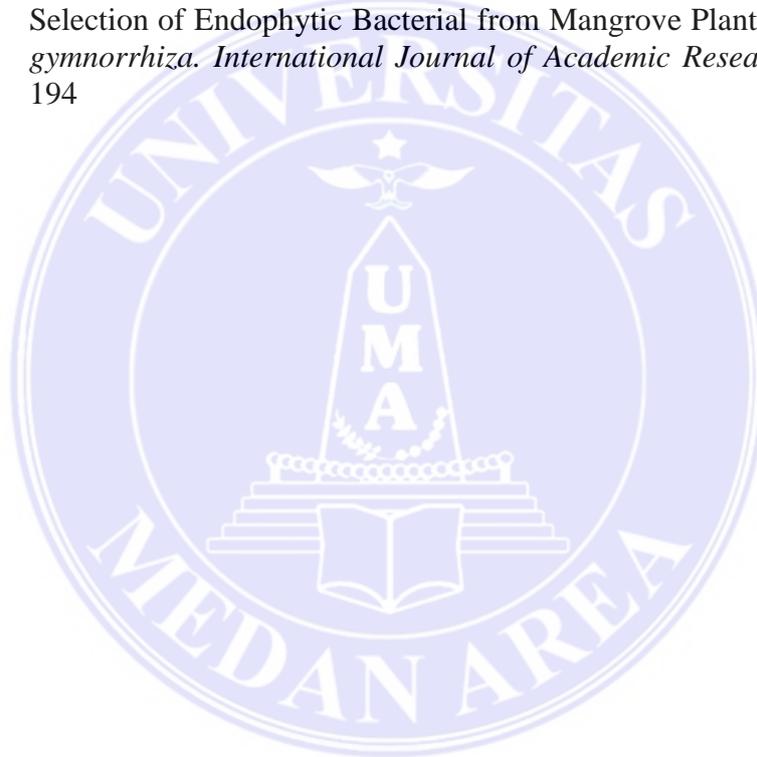
Data diperoleh dengan cara mengumpulkan hasil dari semua pengamatan isolat dari proses dan pengujian antibakteri serta mengukur diameter zona hambat yang terbentuk, pengumpulan data dilaksanakan sebagai berikut: mengamati dan mengidentifikasi isolat bakteri endofit, kemudian dilakukan dengan melihat sifat morfologi sel, morfologi koloni dan pengujian sifat biokimia, dan mengukur diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong dari proses uji antibakteri. Dari sifat-sifat tersebut dapat diidentifikasi bakteri endofit yang bersifat antimikroba dengan buku panduan determinasi bakteri (Holt *et al*, 2000) sehingga dapat ditemukan genus bakteri tersebut. Hasil keseluruhan data pengamatan dipaparkan secara deskripsikan dengan dilengkapi gambar berupa foto.

DAFTAR PUSTAKA

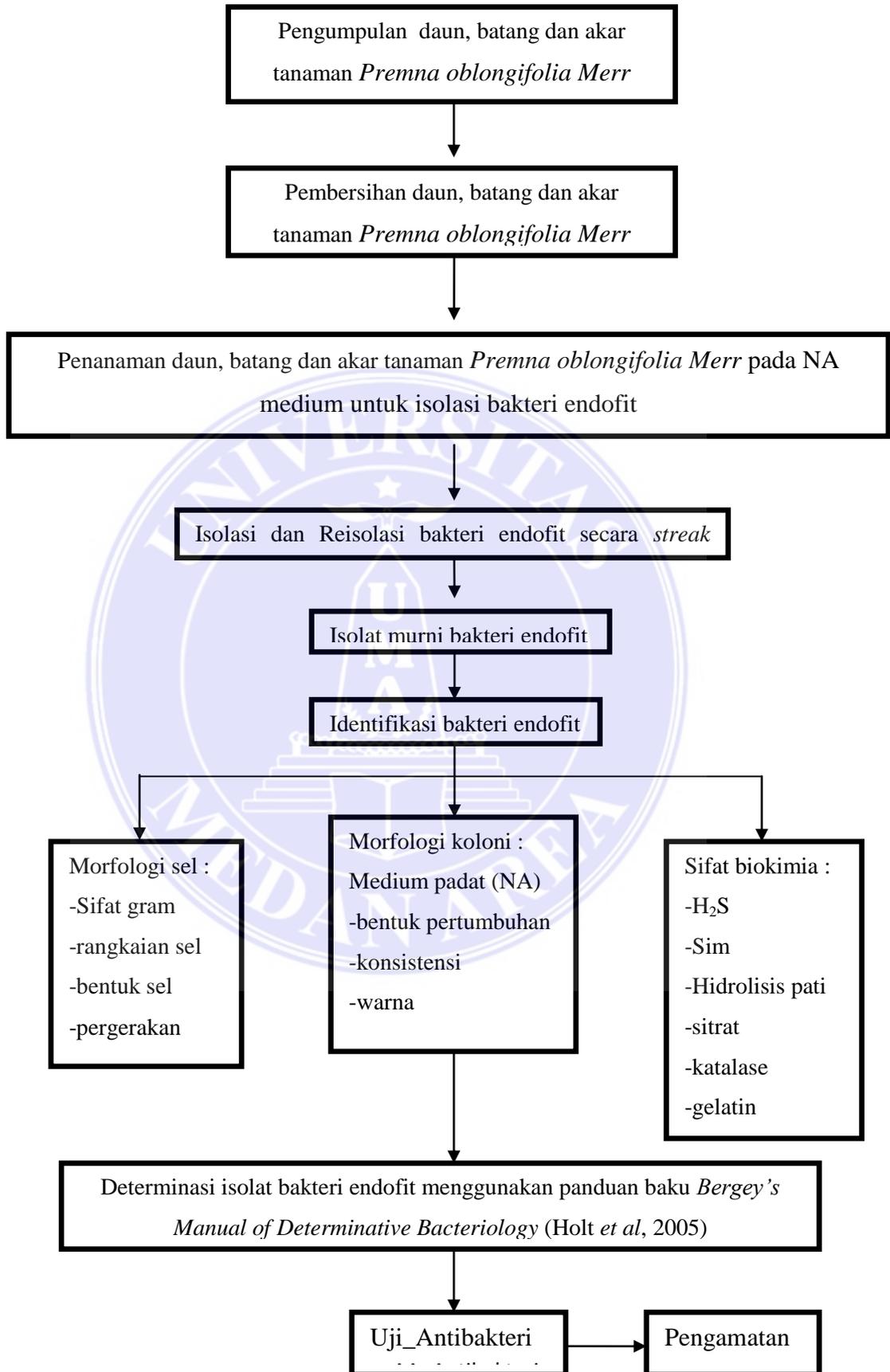
- Angerhofer Ck, *et al.*, 1999. Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bisbenzyl isoquinoline alkaloids. *J.Nat.prod.*62(1):59-66.
- Bergey's, 2005. *Manual of Systematic Bacteriology*. Departement of Microbiology and Molecular Genetics: Michigan State University
- Castilo UF *et al.* 2002. Munumbicins, Wide Spectrum Antibiotics Produced by *Streptomyces* NRRL 30562, Endophytic on *Kennedia Nigriscans*. *Microbiology*. 148: 2675-2685.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., Mitchell, L.G., 2002, *Biology, Fifth Edition (Biologi, Edisi Kelima)*, hal 6, 352-357, Diterjemahkan oleh Lestari, dkk, Jilid 1, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Djam'an, Q. 2008. Pengaruh Air Perasan Daun *Cyclea barbata Miers* (Cincau Hijau) Terhadap Konsentrasi HCl Lambung dan Gambaran Histopatologik Lambung Tikus Galur Wistar yang Diinduksi Acetylsalicylic Acid. Tesis. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Elita, A., Saryono, S., Dan Christine J. 2013. Penentuan Waktu Optimum Produksi Antimikroba dan Uji Fitokimia Ekstrak Kasar Fermentasi Bakteri Endofit *Pseudomonas Sp.* Dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia Variabilis*). *Jurnal. Ind.Che.Acta* Vol. 3 (2)
- Harni.R., dan M.S.D. Ibrahim. 2011. Potensi Bakteri Endofit Menginduksi Ketahanan Tanaman Lada Terhadap Infeksi *Meloidogyne incognita*. Balai Penelitian Tanaman Rempah Dan Aneka Tanaman Industri. *Jurnal Littri* 17 : 118-123
- Horn WS *et al.* 1995. Phomopsichalasin, a Novel Antimicrobial Agent from an Endophytic *Phomopsis Sp.* *Tetrahedron*. 14: 3969-3978.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneth, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 2000, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition*, ha 347, 559, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Jawetz, M, Adelberg. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi ke 15*. Jakarta: Universitas Indonesia Press
- Kasmiran A. 2011. Pengaruh lama fermentasi jerami padi dengan mikroorganisme lokal terhadap kandungan bahan kering, bahan organik dan abu. *Lentera: Juni* 2011. 11(1): 48-52
- Lemmens, R.H.M.J., dan Bunyaphatsara, N., (eds). (2003). *PROSEA: Plant Resources of South-East Asia 12 (1) Medicinal and Poisonous Plants 1*. Bogor: PROSEA Foundation, 219-222.

- Lay, B., 1994. *Analisis Mikrobial di Laboratorium*, 79-101, 129-132, Manajemen PT Grafindo Persada, Jakarta.
- Melliawati .R., D.N.Widyaningrum, A.C.Djohan, & H.Sukiman. 2006. Pengkajian Bakteri Endofit Penghasil Senyawa Bioaktif Untuk Proteksi Tanaman. Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (Lipi). *Biodeversitas* 7 : 221-224
- Mardiah, et.al. 2007. *Makanan Anti Kanker*. Kawan pustaka. Jakarta selatan.
- Ngajow, M., Abidjulu J., and Kamu, V.S. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia Pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*. *Jurnal Mipa Unsrat Online* 2 (2) 128-132
- Nursulistyarini, Fenni Dan Erny Qurotul Ainy. 2013. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Endofit Penghasil Antibakteri Dari Daun Tanaman Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten.) Steenis). *Seminar Nasional Xi Pendidikan Biologi*. FKIP UNS
- Nurdin, Samsu Udayana dan Suharyono A.S. 2008. *Karakteristik Fungsional Polisakarida Pembentuk Gel Daun Cincau Hijau (Premna oblongifolia Merr.)*
- Pelczar, Michael J. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia (UI Press).
- Prescott, Harley. 2002. *Laboratory Exercise in Microbiology, Fifty Edition*. The McGraw-Hill Companies
- Pitojo, Setyo dan Zumiyati. 2005. *Cincau : Cara Pembuatan Dan Variasi Olahannya*. PT. AgroMedia Pustaka. Tangerang.
- Radji, M., 2005, *Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit Dalam Pengembangan Obat Herbal*, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, vo. II, No.3, 113-126.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB Press
- Sjahrurachman, A., 1996, *Resistensi Bakteri terhadap Aminoglikosida*, *Cermin Dunia Kedokteran* No. 108, hal 49
- Sunanto Hatta, *Budidaya Cincau*, Yogyakarta; Penerbit Kanisius; 1995.
- Strobel, G.A., & Daisy, B., 2003, *Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products*, *Microbial. And Mol. Biology Rev.* 67 (4): 491-502.

- Strobel, G.A., Miller, R.V., Miller, C., Condon, M., Teplow, D.B., & Hess, W.M., 1999, *Cryptocandin, a potent antimycotic from endophytic fungus Cryptosporiopsis quercina*. *Microbiology* 145: 1919-1926.
- Stone JK, Bacon CW, White JF Jr., 2000, *An overview of endophytic microbes: endophytism. Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker, Inc. 3-29
- Supardi, Iman dan Sukanto. 2001. *Mikrobiologi dalam Pengolahan dan Keamanan Pangan*. Bandung: Alumni
- Tan RX, Zou WX. 2001. Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites. *Nat Prod Rep*. 18: 448-459.
- Utami, Ulfa. 2011. Isolation, Identification and Antimicrobial Activities Selection of Endophytic Bacterial from Mangrove Plantation *Brugulera gymnorhiza*. *International Journal of Academic Research* 1 (3): 187-194



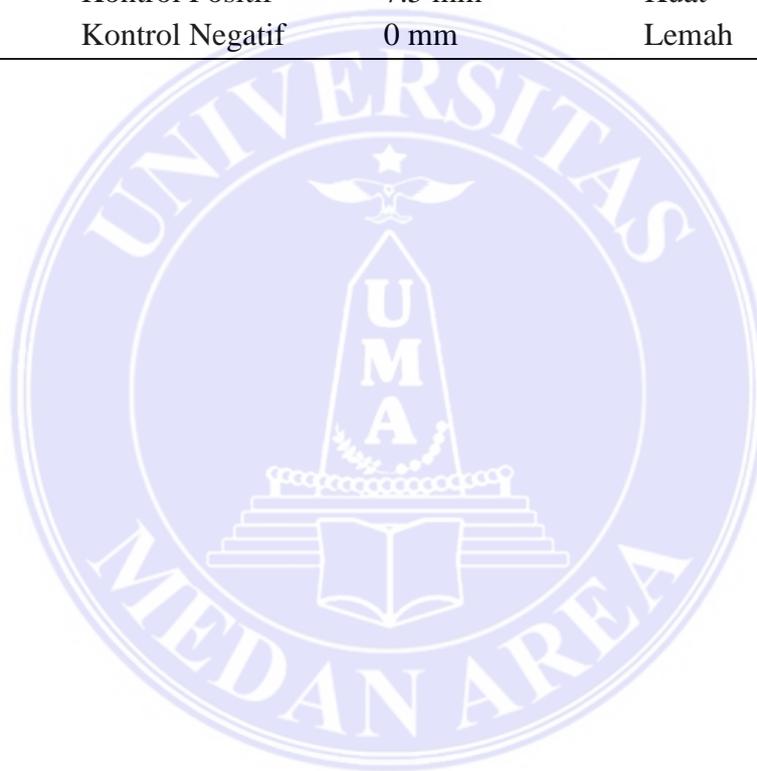
Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian



Lampiran 2. Diameter Zona Hambat

Tabel 1. Diameter zona hambat pada uji aktivitas metabolit bakteri endofit terhadap bakteri *Eschericia coli*

Kode Isolat	Genus	Zona hambat (dalam mm)	
		<i>Eschericia coli</i>	
		panjang	Keterangan
BC1	<i>Sphingomonas</i>	9 mm	Kuat
AC1	<i>Octadecabacter</i>	11 mm	Kuat
AC2	<i>Sphingomonas</i>	8 mm	Kuat
	Kontrol Positif	7.5 mm	Kuat
	Kontrol Negatif	0 mm	Lemah



Lampiran 3. Uji Biokimia



Uji Pembentukan H₂S



Uji Sitrat



Uji Sim & katalase

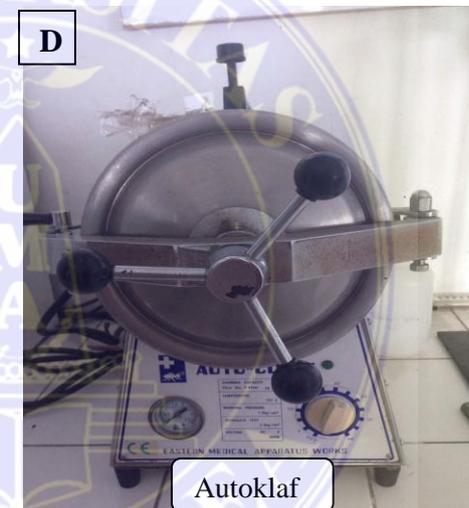
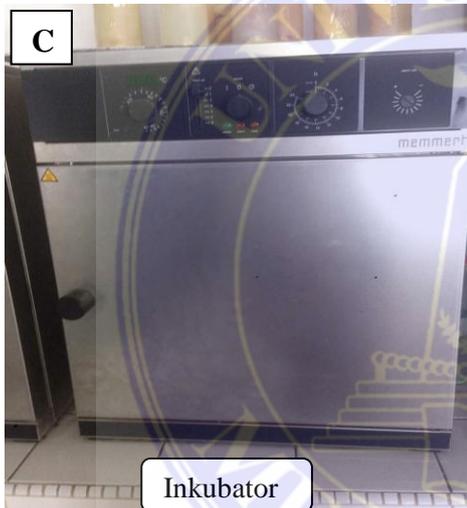


Uji hidrolisa pati



Uji hidrolisa gelatin

Lampiran 4. Alat dan Bahan Penelitian



Lampiran 5. Tabel Hasil Identifikasi Bakteri endofit

Tabel 1

Kode isolat : BC1

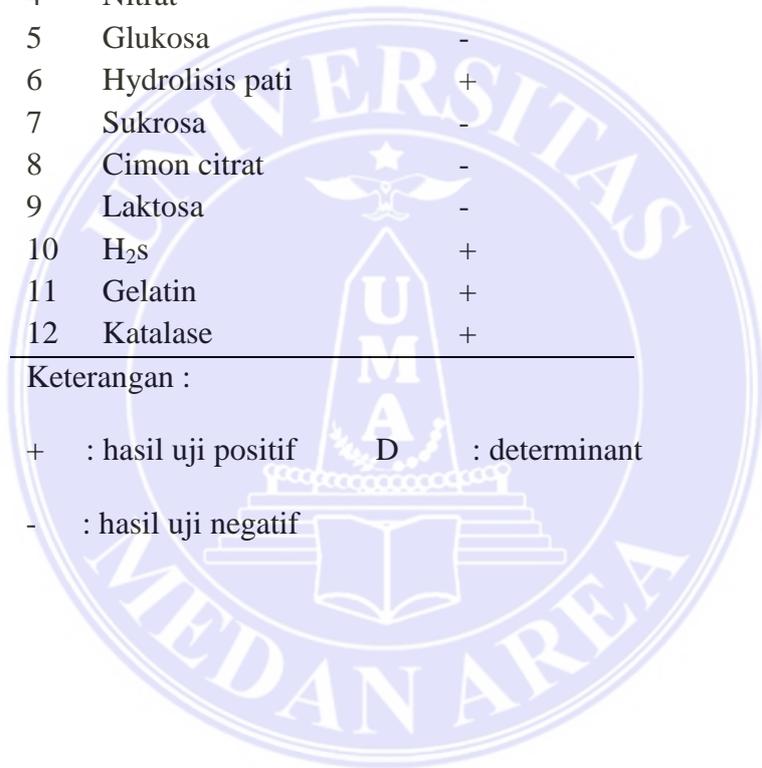
Genus : *Sphingomonas*

No.	Uji Biokimia	Hasil
1	Spora	+
2	Oksidasi	D
3	Motility	+
4	Nitrat	-
5	Glukosa	-
6	Hydrolysis pati	+
7	Sukrosa	-
8	Cimon citrat	-
9	Laktosa	-
10	H ₂ S	+
11	Gelatin	+
12	Katalase	+

Keterangan :

+ : hasil uji positif D : determinant

- : hasil uji negatif



Tabel 2

Kode isolat : AC1

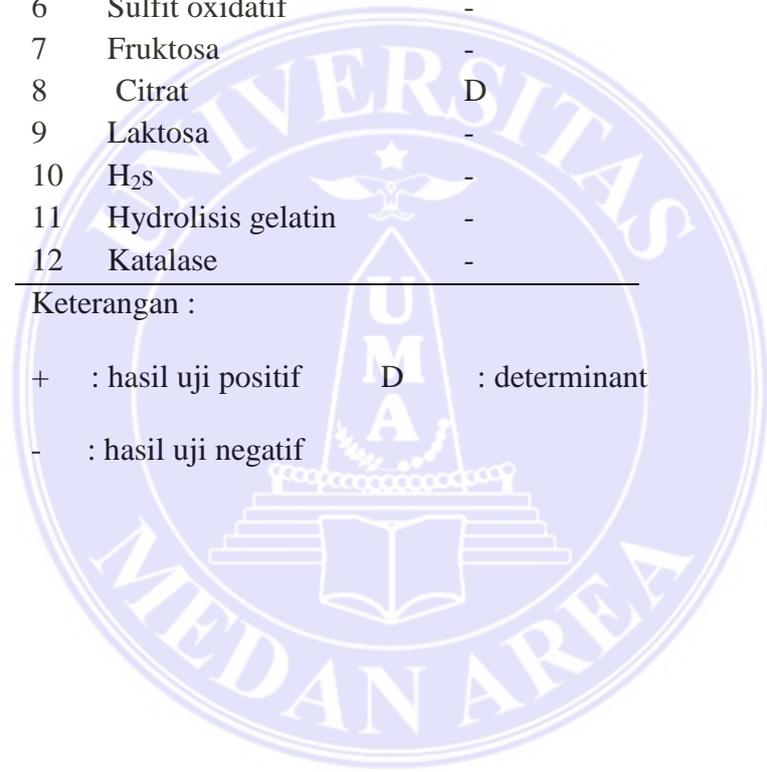
Genus : *Octadecabacter*

No.	Uji Biokimia	Hasil
1	Spora	-
2	Lucine	-
3	Motility	-
4	Gas vacuoles	+
5	Glukosa	+
6	Sulfit oksidatif	-
7	Fruktosa	-
8	Citrat	D
9	Laktosa	-
10	H ₂ S	-
11	Hydrolysis gelatin	-
12	Katalase	-

Keterangan :

+ : hasil uji positif D : determinan

- : hasil uji negatif



Tabel 3

Kode isolat : AC2

Genus : *Sphingomonas*

No.	Uji Biokimia	Hasil
1	Spora	-
2	Oksidasi	D
3	Motility	+
4	Nitrat	+
5	Glukosa	-
6	Hydrolysis pati	+
7	Lysine	-
8	Cimon citrat	-
9	Urease	-
10	H ₂ S	+
11	Hydrolysis gelatin	+
12	Katalase	+

Keterangan :

+ : hasil uji positif D : determinant

- : hasil uji negatif

