

**AKTIVITAS BAKTERI FILOSFER DAUN REUNDEU (*Staurogyne longata*)
SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA ANTIMIKROBA POTENSIAL**

Debie Rizqoh¹, Nita Ratna Sari², Rina Nurlia Wati³, Fery Santosa⁴, Rianita Hasanah⁵
¹Program Studi DIII Analis Kesehatan, Fakultas Farmasi dan Ilmu Kesehatan, Universitas Sari
Mutiara Indonesia

*Email: debie.rizqoh@gmail.com

Abstrak

Di alam banyak ditemukan mikroba patogen yang dapat menimbulkan penyakit pada manusia, contohnya seperti enteropatogenik *Escherichia coli* (EPEC), *Staphylococcus aureus*, *Candida tropicalis*, dan *Candida albicans*. Mikroba tersebut dapat ditanggulangi dengan menggunakan senyawa antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba tersebut. Reundeu (*Staurogyne longata*) merupakan salah satu tanaman yang daunnya dikonsumsi sebagai lalapan. Permukaan daun Reundeu merupakan habitat mikroflora tertentu seperti bakteri filofser. Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui kemampuan bakteri filofser daun reundeu untuk menghasilkan senyawa antimikroba. Metode penelitian antara lain mengisolasi bakteri dari sampel daun utuh dengan metode cawan sebar (*spread plate method*). Setelah mendapatkan isolat murni, dilakukan uji Gram dan uji antimikroba untuk mengetahui senyawa antibakteri yang dihasilkannya. Penelitian ini juga menguji aktivitas patogen dengan menggunakan media agar darah. Setelah itu konsentrasi penghambatan ditentukan dengan metode MIC (*minimum inhibitory concentration*). Bakteri diidentifikasi dengan analisis sekuensing dari ampikon gen pengkode 16s rRNA, analisis bioinformatik dan pembuatan pohon filogenetik. Hasil penelitian menunjukkan dapat diidentifikasi 25 isolat bakteri filofser reundeu penghasil senyawa antimikroba yang dapat menghambat empat bakteri patogen dengan spektrum berbeda-beda. Terdapat lima isolat yang mempunyai spektrum paling baik yaitu FR3, FR5, FR11, FR17 dan FR40. Kelima isolat tersebut mempunyai konsentrasi penghambatan yang berbeda-beda. Identifikasi secara genetik menunjukkan bahwa kelima isolat tersebut berkerabat dekat dengan spesies *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas stutzeri*, dan *Bacillus sp.*

Kata kunci : antimikroba, bakteri filofser, reundeu.

1. PENDAHULUAN

Di alam ini, banyak ditemukan mikroba yang bersifat patogen. Mikroba patogen ini berbahaya karena dapat menyebabkan berbagai macam penyakit (Pelczar & Chan 2005). Mikroba yang bersifat patogen antara lain enteropatogenik *Escherichia coli* (EPEC) (Kaufmann *et al.* 2006), *Staphylococcus aureus* (Salle 1961), *Candida tropicalis* (Minagi *et al.* 1985), dan *Candida albicans* (Jang 2006). Sampai saat ini pemberian antimikroba dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroba patogen tersebut. Antimikroba dapat diproduksi oleh organisme tertentu yang dapat meningkatkan pertahanan diri organisme tersebut (Madigan *et al.* 2000).

Substansi antimikroba dalam hal ini antibiotik merupakan bahan alam atau sintetik yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroba dalam hal ini bakteri. Antibiotik secara ilmiah diproduksi oleh organisme tertentu dan bermanfaat untuk meningkatkan kemampuan organisme tersebut mempertahankan diri dari serangan organisme lain. Selain itu, antibiotik juga dapat berasal dari hasil metabolisme sekunder dari interaksi antara dua organisme berbeda (Madigan *et al.* 2000). Antibakteri merupakan salah satu fenomena antagonisme yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan bahkan kematian suatu mikroba oleh mikroba lain yang terjadi secara langsung maupun tidak langsung (Kasim *et al.* 2005).

Reundeu (*S. longata*) selain dimanfaatkan sebagai lalapan juga dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat (Hariana 2006). Reundeu digunakan dalam penelitian ini karena sering digunakan sebagai lalapan. Lalapan sangat baik untuk kesehatan karena kandungan gizi dan vitamin tidak berkurang serta tidak rusak oleh proses memasak. Selain itu, berbagai jenis mikroflora terdapat pada sayuran mentah tersebut, meskipun telah dicuci sebelum dikonsumsi, bakteri epifit masih dapat ditemukan (Hamilton-Miller & Shah 2001).

Bakteri epifit yang menghuni di sekitar permukaan daun disebut bakteri filosfer (Lindow & Brandl 2003). Pada kelembapan tinggi seperti daerah beriklim tropis dan sedang, berbagai mikroflora daun banyak ditemukan (Madigan *et al.* 1997). Komunitas mikroba

filosfer sangat kompleks. Hal tersebut dibuktikan oleh Menurut Yang *et al.* (2000), dengan menggunakan metode kultur *dependent* dan *independent*. Kompleksitas tersebut tidak dapat dibuktikan dengan metode kultur konvensional. Populasi bakteri epifit baik dari segi jenis maupun ukuran sangat bervariasi walaupun untuk tumbuhan dalam satu spesies. (Lindow & Brandl 2003).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya, diketahui bahwa daun reundeu mengandung berbagai macam bakteri filosfer yang menghasilkan antibakteri. Laporan tersebut juga menyebutkan bahwa bakteri filosfer reundeu aktif menghambat bakteri Gram positif seperti *E. coli* dan bakteri gram negatif seperti *B. subtilis* dan *S. aureus* (Rizqoh *et al.* 2009).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh bakteri filosfer reundeu terhadap berbagai mikroba patogen dan melakukan karakterisasi beberapa isolat bakteri filosfer berdasarkan sekuen DNA penyandi 16S rRNA. Isolat yang digunakan untuk penelitian ini merupakan isolat yang sama dengan penelitian studi lapangan yang telah dilakukan sebelumnya (Rizqoh *et al.* 2009). Mikroba patogen yang digunakan pada penelitian ini yaitu enteropatogenik *E. coli* (EPEC), *S. aureus*, *C. tropicalis*, dan *C. albicans*. Mikroba patogen tersebut merupakan mikroba yang sering menginfeksi makhluk hidup, termasuk manusia.

2. METODE

Peremajaan isolat bakteri filosfer reundeu

Peremajaan dilakukan terhadap 61 isolat bakteri filosfer yang sebelumnya telah diisolasi. Media yang digunakan pada isolasi bakteri filosfer adalah Media agar King's B. Komposisi dari media King's B adalah pepton (20 g/L), Agar (15 g/L), K₂HPO₄ (1,5 g/L), Mg₂SO₄ (1,5 g/L), gliserol (15 ml/L), dan akuades (1L).

Peremajaan mikrob target

Mikrob yang akan digunakan pada uji antagonis harus ditumbuhkan pada media *Nutrient Broth* (NB) untuk bakteri *E. coli* enteropatogen (EPEC) dan *S. aureus* dan *Potato Dextrose Agar* (PDA) untuk cendawan *C.*

tropicalis, dan *C. albicans*. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37 °C.

Uji Antimikroba

Uji antimikroba isolat filosfer terhadap pertumbuhan mikrob target dilakukan dengan menggunakan teknik media agar dua lapis yang terdiri dari media semi padat dan media padat. Bakteri target yang telah diukur kekeruhannya dengan spektrofotometri (OD = 0,3, konsentrasi 10^6 - 10^7 sel/ml) dalam medium kaldu dicampur ke dalam media semi padat, lalu dituangkan di atas media padat yang telah dibekukan sebelumnya pada cawan. Setelah beku, isolat bakteri filosfer digoreskan di atasnya. Uji antagonis untuk *E. coli* enteropatogen (EPEC) dan *S. aureus* menggunakan media NA, sedangkan untuk *C. albicans* dan *C. tropicalis* menggunakan media PDA. Biakan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Pengamatan antimikroba dilakukan setelah biakan uji antagonis telah diinkubasi selama 24 jam. Isolat bakteri dikatakan positif menghasilkan antimikrob apabila isolat tersebut menghasilkan zona bening pada uji antagonis. Isolat bakteri filosfer yang positif menghasilkan antimikroba kemudian diinokulasi ke dalam media NB. dan diinkubasi di suhu ruang selama 24 jam.

Uji MIC

Mikrob target diremajakan kembali untuk digunakan dalam uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Mikrob target ini juga dibiakkan dalam media NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

Isolat bakteri filosfer penghasil antimikroba yang telah diinkubasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 30 menit. Supernatan (diduga mengandung senyawa antimikroba) yang diambil hasil sentrifugasi dimasukkan kedalam 5 tabung reaksi dengan konsentrasi yang berbeda-beda masing-masing 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Selain itu, dibuat juga kontrol positif dengan menambahkan antibiotik standar yang dapat menghambat mikroba target dan kontrol negatif dengan tidak menambahkan antibiotik maupun supernatan bakteri filosfer. Setelah itu, masing-masing tabung diisi dengan 1 ml bakteri target. Biakan

uji MIC tersebut lalu diinkubasi selama 24 jam. Kemudian diamati kekeruhan masing-masing biakan di dalam tabung reaksi. MIC ditentukan berdasarkan kekeruhan biakan.

Uji Patogenisitas

Permukaan media agar darah digoreskan isolat bakteri filosfer. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam, lalu diamati ada atau tidaknya zona bening. Isolat yang disekitarnya terdapat zona bening berarti bersifat patogen.

Isolasi Genom (Metode CTAB)

Sebanyak 1.5 ml kultur bakteri filosfer disentrifugasi 10000 rpm selama 10 menit. Pelet diresuspensi menggunakan bufer TAE 1x dan disentrifugasi kembali. Sebanyak 5 µl lisozim ditambahkan kedalam suspensi, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. SDS (*Sodium Duodecyl Sulfate*) 10% sebanyak 500 µl ditambahkan kedalam campuran, inkubasi dilakukan selama 60 menit pada suhu 37 °C. Sebanyak 100 µl CTAB (*Cetyltrimethylammonium Bromide*) 10% dan 80 µl NaCl 5M ditambahkan lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu 65°C. Pemisahan DNA dari molekul organik lainnya dilakukan dengan penambahan 650 µl PCI (phenol:chloroform:isoamyl alcohol = 25:24:1), kemudian campuran disentrifugasi 12000 rpm selama 10 menit, lapisan atas pada tabung mikro dipindahkan ke tabung mikro yang baru lalu ditambahkan 650 µl larutan PCI. Campuran disentrifugasi 12000 rpm selama 10 menit. Lapisan atas dipindahkan ke tabung mikro baru dan ditambah etanol absolut sebanyak 2x volume larutan suspensi DNA. Inkubasi dilakukan 12 jam pada suhu -20 °C untuk mengendapkan DNA. Suspensi disentrifugasi 12000 rpm selama 10 menit. Pelet DNA dibilas dengan etanol 70%. Pelet dibiarkan kering udara. Setelah kering, pelet DNA diresuspensi dengan 20 µl ddH₂O steril. Visualisasi hasil isolasi DNA genom dilakukan dengan metode elektroforesis pada gel agarosa 0,8%, 100 V selama 30 menit.

Amplifikasi Gen Pengkode 16s-rRNA dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reaksi PCR untuk mengamplifikasi 16s-rDNA dilakukan dengan mencampurkan 12.5 bufer PCR GC II, 4 μ l dNTPs (2.5 mM/dNTP), 1 μ l primer 63 f (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) (5 nm), 1 μ l primer 1387 r (GGGCGGWTGTACAAGGC) (5 nm), 4 μ l DNA cetakan, dan 0.25 μ l (5 unit/ μ l) enzim Taq DNA polymerase (TAKARA) dan 2.25 μ l ddH₂O hingga volume reaksi PCR menjadi 25 μ l. Reaksi PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dengan masing-masing tahap yaitu: 1. Predenaturasi (94 °C, 5 menit); 2. Denaturasi (94 °C, 1 menit); 3. Annealing (55 °C, 1 menit); 4. Polimerisasi (72 °C, 1 menit). Post PCR dilakukan pada suhu 72 °C selama 2 menit. Visualisasi ampikon 16s-rDNA dilakukan melalui elektroforesis pada gel agarosa 0,8%, 100 V selama 30 menit.

Hasil amplifikasi gen PCR ini kemudian disekuen untuk mengetahui susunan basa pada DNA bakteri. Susunan basa DNA tersebut lalu dianalisis bioinformatik untuk mengidentifikasi jenis bakteri filofera reundeu. Setelah diketahui spesies bakteri filofera reundeu, selanjutnya dianalisis kekerabatannya dengan membuat pohon filogenetik.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji antimikroba telah dilakukan terhadap 4 macam mikroba target yaitu Enteropatogenik EPEC, *S. aureus*, *C. albicans*, dan *C. tropicalis*. Adanya senyawa antimikroba ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening (Gambar 1(a) dan (b)). Selain uji antimikroba, uji patogenisitas juga telah dilaksanakan untuk mengetahui adanya potensi patogenisitas pada bakteri filofera reundeu. Apabila bakteri positif patogen, maka akan terbentuk zona bening pada media agar darah (Gambar 1 (c)).

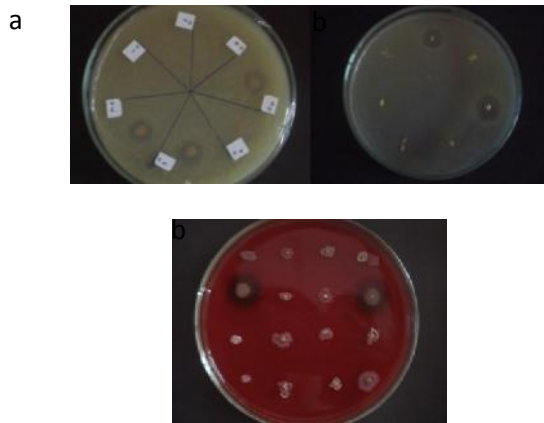
Berdasarkan hasil penelitian ini, didapatkan sebanyak 25 isolat dari 61 isolat yang kemungkinan menghasilkan senyawa bioaktif terhadap keempat mikroba patogen. Lima isolat bakteri filofera yang positif menghasilkan senyawa bioaktif terhadap EPEC, 10 isolat bakteri filofera menghambat *S. aureus*, 14 isolat penghasil anti-*C. albicans* dan satu isolat yang menghambat *C. tropicalis*.

Setelah dilakukan uji antimikroba, beberapa isolat potensial diuji lanjut untuk mengetahui konsentrasi minimum penghambatannya. Uji MIC (*Minimum Concentration Inhibitor*) merupakan uji yang dilaksanakan terhadap suatu sediaan antimikroba atau desinfektan untuk diketahui konsentrasi terendah dari antimikroba tersebut dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Isolat yang diuji MIC ada lima buah yaitu isolat FR3, FR5, FR11, FR17 dan FR40. Setelah dihitung nilai MIC, isolat diencerkan lalu ditumbuhkan ke cawan dengan metode sebar untuk mengetahui aktivitas penghambatannya. Apabila pada cawan masih tumbuh bakteri target, maka aktivitasnya hanya sebatas penghambatan mikroba (bakteriostatik/fungistatik). Namun apabila pada cawan tidak tumbuh bakteri target, aktivitas antimikroba tersebut telah dapat mematikan mikroba (bakterisida/ fungisida) (Madigan et al. 2000). Hasil MIC secara keseluruhan dijelaskan pada Tabel 2 dan 3.

Salah satu cara untuk mengetahui petunjuk evolusi organisme prokariot adalah dengan menggunakan genotyping 16S rRNA karena gen ini merupakan gen lestari dari generasi ke generasi. Untuk mempermudah mendapatkan gen tersebut, kami melakukan perbanyakan DNA dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan primer spesifik pengkode 16s rRNA (Marchesi et al. 1998). Visualisasi hasil PCR menunjukkan bahwa setiap isolat gen pengkode 16S rRNA berhasil diamplifikasi dengan ukuran 1300 pb (Gambar 2).

Setelah melakukan PCR, kemudian dilakukan *sequencing* untuk mengetahui urutan basa penyusun gen 16S rRNA tersebut. Urutan basa penyusun gen pengkode 16S rRNA yang telah diketahui digunakan untuk menentukan spesies bakteri berdasarkan data pada bank gen. Dari pencocokan dengan data pada bank gen, diketahui kelima isolat yang diujikan, yaitu FR3, FR5, FR11, FR17 dan FR40 adalah *Klebsiella pneumoniae* strain V2, *Klebsiella pneumoniae* strain V2, *Bacillus subtilis* strain PEBS2501, *Pseudomonas stutzeri* isolat GR21, dan *Bacillus sp.* BACI-TOLU1. Masing-masing memiliki E value 0.0 dan *Max Identity* 100%

yang menunjukkan bahwa urutan basa tersebut sudah pernah teridentifikasi dan urutan basa yang ada sama dengan nama organisme yang telah memiliki data gen pengkode 16S rRNA.



Gambar 1 (a) dan (b) Hasil uji antimikroba yang positif ditunjukkan dengan pembentukan zona bening di sekitar isolat filosfer reundeu. (c) Hasil uji patogenisitas juga ditunjukkan dengan pembentukan zona bening.

Tabel 2. Hasil MIC terhadap bakteri patogen

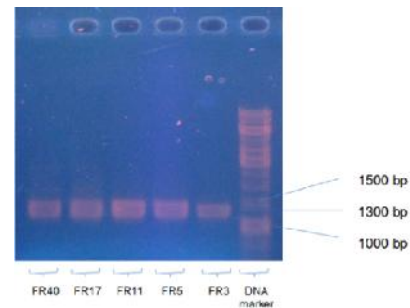
Bakteri patogen	Isolat	MIC	Bakterisida/ Bakteriostatik
EPEC	FR3	100%	Bakteriostatik
	FR5	100%	Bakteriostatik
	FR11	100%	Bakteriostatik
	FR17	100%	Bakteriostatik
<i>S. aureus</i>	FR17	6,25%	Bakteriostatik

Tabel 3. Hasil MIC terhadap cendawan patogen

Cendawan patogen	Isolat	MIC	Fungisida/ Fungistatik
<i>C. albicans</i>	FR3	6,25%	Fungisida
	FR5	6,25%	Fungistatik
	FR11	6,25%	Fungistatik
	FR40	50%	Fungistatik

Setelah diketahui spesies dari isolat filosfer reundeu, selanjutnya dilakukan analisis filogenetik. Analisis filogenetik ini dilakukan untuk mengetahui kekerabatan antar bakteri filosfer reundeu maupun kekerabatan antara

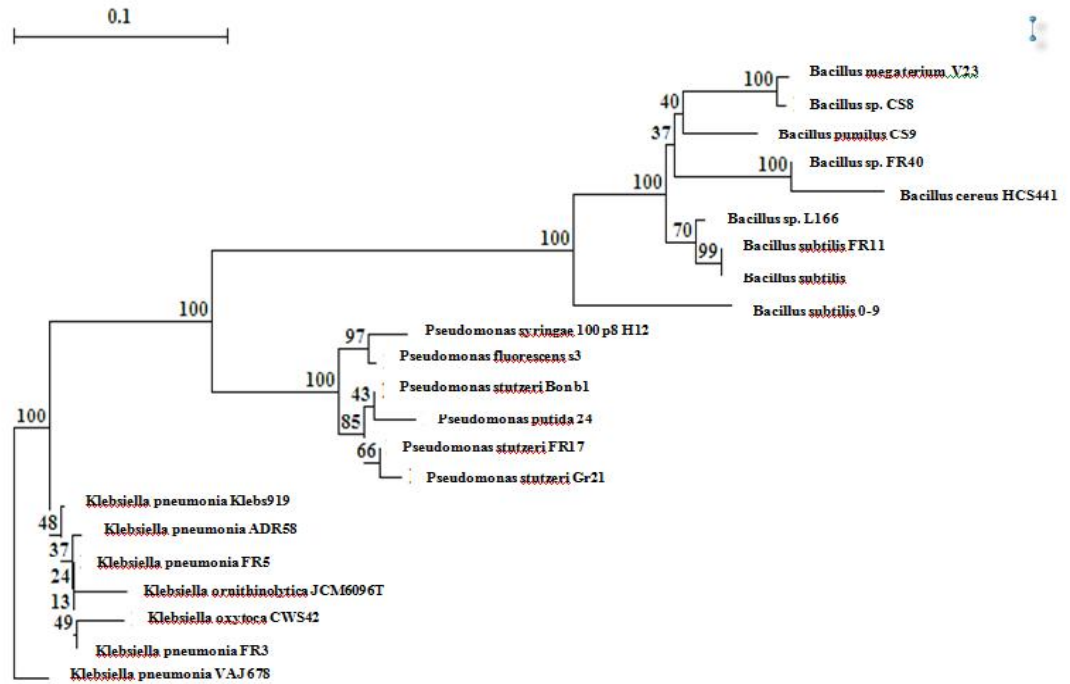
bakteri filosfer reundeu dengan bakteri yang telah diidentifikasi dari penelitian sebelumnya dari Gene Bank (NCBI). Gambar 3 menunjukkan hubungan kekerabatan kelima isolat bakteri filosfer reundeu berdasarkan analisis DNA bakteri tersebut dengan menggunakan analisis bioinformatik standar (Claverie & Notredame 2007).



Gambar 2. Hasil visualisasi amplifikasi gen pengkode 16s rRNA ribosom dengan teknik PCR menunjukkan pita yang dihasilkan DNA isolat filosfer reundeu umumnya memiliki ukuran sekitar 1300 bp (basa pair/pasang basa).

4. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa beberapa bakteri filosfer reundeu diduga dapat memiliki kemampuan menghasilkan senyawa antimikrob dan menghambat empat mikroba patogen yaitu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida tropicalis*, dan *Candida albicans*. Konsentrasi minimal penghambatan bagi bakteri patogen *E. coli* adalah 100% dari empat isolat dan bagi *S. aureus* sebesar 6,35%. *C. albicans* terhambat pada konsentrasi minimal 6,25% dari keempat isolat bakteri filosfer. Bakteri filosfer reundeu yang menghasilkan substrat yang kemungkinan memiliki aktivitas antimikroba termasuk dalam strain *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas stutzeri*, dan *Bacillus sp.*



Gambar 3. Pohon filogenetik menunjukkan posisi kekerabatan bakteri filosfer reundeu pada tiga kelompok besar yaitu FR3 dan FR5 berkerabat sangat dekat dengan beberapa spesies pada genus *Klebsiella* , FR 17 berada dalam kekerabatan genus *Pseudomonas* serta FR11 dan FR40 yang termasuk dalam keluarga genus *Bacillus*.

Hasil penelitian ini belum bisa diaplikasikan ke masyarakat. Masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Meskipun dari hasil penelitian ini membuktikan bahwa pada daun reundeu mengandung bakteri filofser penghasil senyawa antimikroba, tetapi masyarakat harus tetap waspada dalam mengkonsumsi lalapan karena kemungkinan dapat ditemukan bakteri patogen.

5. REFERENSI

- Claverie JM, Notredame C. 2007. Bioinformatic for Dummies. 2nd Ed. Canada: Wiley Publishing, Inc.
- Geornaras I, Holy Av. 2001. Antimicrobial susceptibilities of isolates of *Staphylococcus aureus*, *Listeria species* and *Salmonella serotypes* associated with poultry processing. *Int J Food Microbiol* 70: 29–35.
- Hamilton-Miller JMT, Shah S. 2001. Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. *Int J Antimic Agents* 18: 81–83.
- Hariana A. 2006. Tumbuhan Obat dan Khasiatnya. Jakarta: Niaga Swadaya.
- Jang WS et al. 2006. Antifungal activity of synthetic peptide derived from halocidin, antimicrobial peptide from the tunicate, *Halocynthia aurantium*. *Fed Europ Biochem Societ* 580: 1490-1496.
- Kasim E, Yulinery R, Hardiningsih R, Triana E, Napitupulu RNR. 2005. Daya anti *Staphylococcus aureus* dari fermentasi daun beberapa jenis tumbuhan obat. *Biol Indones* 3: 397-404.
- Kaufmann M et al. 2006. *Escherichia coli* O157 and non-O157 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* in Fecal Samples of Finished Pigs at Slaughter in Switzerland. *J Food Protec* 69: 260-266.
- Lindow SE, Brandl M.T. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Apl Environl Microbiol.* 69 (4):1875-1883.
- Madigan MT, Martinko J.M., Parker J. 2000. *Brock Biology of Microorganism*. Eight Edition. Prentice Hall International, Inc.
- Marchesi JR et al. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *App Env Microbiol* 64: 795-799.
- Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginata H. 1985. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infection and Immunity* 47: 11-14.
- Noer IS, Hendra EC. 2008. Antimicrobial Arien (*Hypnea cervicornis*) asal Gili Kondo terhadap *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* & *Escherichia coli*. *Biotika* 5: 28-34.
- Pelczar M J, Chan ECS. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Rizqoh D, Wati RN, Santosa F, Sari NR. 2009. Bakteri filofser daun reundeu (*Staurogyne longata*) penghasil senyawa antibakteri asal Wana Wisata Cangkuang. [laporan]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Tünger Ö, Özbakkalo lu B, Aksoy H. 2001. Trends in antimicrobial resistant staphylococci in an university hospital over a 6-year period. *Int J Antimic Agents* 18: 93–96.
- Yang CH, Crowley DE, Borneman J, Keen NT. 2001. Microbial phyllosphere population are more complex than previously realized. *Proc Natl Acad Sci* 98: 3889-3894