



AKTIVITAS ANTIMIKROBA BAKTERI ENDOFIT DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica* L.) TERHADAP *Propionibacterium acnes*

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BACTERIAL ENDOPHYTES ISOLATED FROM PEGAGAN LEAVES (*Centella asiatica* L.) AGAINST *Propionibacterium acnes*

Riki Vernando¹, Mahyarudin^{2*}, Ambar Rialita³

¹Prodi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Indonesia

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Indonesia

³Departemen Dermatovenerologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Indonesia

*Corresponding author: mahyarudin@medical.untan.ac.id

Naskah Diterima: 1 April 2021; Direvisi: 2 September 2021; Disetujui: 28 Mei 2022

Abstrak

Tingginya angka kejadian jerawat dan meningkatnya resistensi terhadap antimikroba memerlukan alternatif pengobatan yang berasal dari bahan alam. Beberapa studi menunjukkan bahwa bakteri endofit tertentu memproduksi senyawa bioaktif yang memiliki efek bagi kesehatan, terutama bakteri endofit yang diisolasi dari tumbuhan obat. Pegagan (*Centella asiatica* L.) merupakan tumbuhan obat yang mempunyai banyak manfaat seperti untuk mengobati masalah kulit, menyembuhkan luka, serta menjadi agen antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimikroba isolat bakteri endofit daun pegagan terhadap *Propionibacterium acnes*. Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode difusi cakram melalui pengukuran diameter zona hambat. Bakteri endofit yang didapat dari penelitian sebelumnya dikarakterisasi berdasarkan ciri-ciri dari morfologi koloni, morfologi sel, dan aktivitas biokimia. Sembilan belas isolat bakteri endofit memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Propionibacterium acnes*, ditandai dengan terbentuknya zona hambat berdiameter antara 11,46–25,34 mm. Dua isolat yang memiliki kemampuan aktivitas antimikroba yang paling besar, yaitu isolat nomor 3 dan 17 dengan hasil identifikasi termasuk ke dalam genus *Aeromicrobium*. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bakteri endofit dari daun pegagan (*Centella asiatica* L.) berpotensi sebagai antimikroba terhadap bakteri *P. acnes*.

Kata kunci: Aktivitas antimikroba; Isolat bakteri endofit daun pegagan; *Propionibacterium acnes*; Zona hambat

Abstract

The high prevalence of acne cases and the increasing resistance to antimicrobials requires alternative treatments that originate from natural ingredients. Several studies have shown that certain endophytic bacteria produce bioactive compounds that benefits human health, especially those whom isolated from medicinal plants. Gotu kola or pegagan (*Centella asiatica* L.) is one of medicinal plant that has many benefits such as treating skin problems, healing wounds, and also known for an antibacterial agent. The aim of the study was to determine the antimicrobial activity of the endophytic bacterial isolates of pegagan against *Propionibacterium acnes*. The antimicrobial activity test were carried out using the disc diffusion method by measuring the diameter of the inhibition zone within isolate. Endophytic bacteria obtained from previous studies were characterized based on the characteristics of colony morphology, cell morphology and biochemical activity. 19 isolates of endophytic bacteria showed antimicrobial activity against *P. acnes*, indicated by the formation of inhibition zones ranging from 11.46 to 25.34 mm. Two isolates that had the greatest antibacterial activity, namely isolates number 3 and 17 were identified and belongs to the genus *Aeromicrobium*. Based on the results of this study, it can be concluded that endophytic bacteria from pegagan (*Centella asiatica* L.) leaves has potential as an antibacterial agent against *Propionibacterium acnes* bacteria.

Keywords: Antibacterial activity; Inhibition growth zones; Pegagan leaves bacterial endophytes; *Propionibacterium acnes*

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v16i1.20276>

PENDAHULUAN

Jerawat (*Acne vulgaris*) merupakan penyakit radang multifaktorial yang memengaruhi folikel pilosebacea dan inflamasi kronis pada kulit (Zaenglein et al., 2016). Jerawat terbentuk karena adanya sumbatan pada folikel pilosebacea, produksi sebum berlebihan, inflamasi, faktor genetik, hormonal, kosmetik, dan aktivitas dari bakteri *Propionibacterium acnes* (Zaenglein et al., 2016; Muzdalifah & Adi, 2016). Bakteri *P. acnes* merupakan bakteri flora normal pada folikel pilosebacea. Bakteri ini umumnya tidak menginfeksi kulit yang sehat. Kulit yang tidak terawat akan menyebabkan pertumbuhan yang berlebih dari *P. acnes*, sehingga dapat menginfeksi kulit dan menimbulkan jerawat (Achermann et al., 2014).

Antibiotik yang sering digunakan untuk pengobatan jerawat, seperti klindamisin, oksitetrasiklin, minosiklin, doksisisilin, dan eritromisin (Kim et al., 2018). Penggunaan antibiotik jangka panjang, akan menyebabkan resistensi. Oleh karena itu, dibutuhkan alternatif lain untuk mengatasi infeksi bakteri terutama pada kasus jerawat, contohnya penggunaan senyawa antibiotik bakteri endofit dari tanaman obat. Bakteri endofit memiliki kemampuan menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, dan saponin (Aksara et al., 2013). Senyawa metabolit sekunder umumnya mempunyai kemampuan bioaktivitas dan berfungsi sebagai antibakteri (Cotter et al., 2013; Brackman & Coenya, 2015; Akbar & Budiarti, 2016).

Pengobatan jerawat secara tradisional menggunakan daun pegagan sudah pernah dilakukan. Daun pegagan diketahui mengandung beberapa komponen senyawa triterpenoid (Jagtap et al., 2009). Tumbuhan pegagan digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati masalah kulit, menyembuhkan luka, dan menjadi agen antimikroba (Hamid et al., 2002). Bakteri endofit tersebut merupakan mikroorganisme yang dapat diekstrak atau diisolasi dari biji, akar, batang, daun, ranting, dan kulit kayu dari berbagai macam jenis tanaman termasuk tumbuhan pegagan (Prasetyoputri, 2011).

Bakteri endofit memiliki kemampuan menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti senyawa antibiotik, antikanker, antifungi, antivirus, dan dapat menjadi agen insektisida (Kusumawati et al., 2014; Strobel, 2003; Guan et al., 2005). Senyawa-senyawa yang tergolong ke dalam kelompok metabolit sekunder, antara lain alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, dan saponin. Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktivitas dan berfungsi sebagai antimikroba (Aksara et al., 2013). Selain metabolit sekunder, salah satu bakteri endofit *C. asiatica* yakni *Pseudomonas* sp. juga menghasilkan enzim yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen ialah *pyrrolnitrin*. Oleh karena itu, bakteri endofit mempunyai potensi sebagai antibiotik (Pee, 2012).

Beberapa penelitian mengenai aktivitas bakteri endofit pegagan telah banyak dilakukan di Indonesia. Salah satunya adalah penelitian aktivitas antimikroba bakteri endofit daun pegagan (*C. asiatica* L.) terhadap *E. coli* (Adityawarman, 2019). Aktivitas *quorum quenching* bakteri Gram positif endofit tanaman pegagan (*C. asiatica*) terhadap *Chromobacterium violaceum* (Faisal et al., 2018). Penelitian mengenai aktivitas antimikroba isolat bakteri endofit daun pegagan terhadap bakteri *P. acnes* hingga saat ini belum pernah dilakukan di Kalimantan Barat. Namun, sudah pernah dilakukan di Makassar dengan judul Isolasi dan karakterisasi molekuler mikroba endofit tanaman pegagan (*Centella asiatica* L.) sebagai penghasil antimikroba (Hidayat et al., 2018). Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti tertarik untuk meneliti bakteri endofit dari daun pegagan untuk mengetahui kemampuannya sebagai penghasil metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antimikroba bakteri *P. acnes*.

MATERIAL DAN METODE

Bakteri yang digunakan adalah 37 isolat bakteri endofit yang diperoleh dari penelitian Faisal et al. (2018) dan Nur et al. (2018) dan biakan bakteri *P. acnes* yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi FK UI.

Pengamatan Morfologi Koloni dan Sel Bakteri Endofit

Bakteri endofit daun pegagan yang tumbuh pada media isolasi *Nutrient Agar* (NA) diremajakan pada media NA yang baru dengan metode gores dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24–48 jam (Faisal et al., 2018). Karakteristik sel bakteri endofit yang diamati adalah bentuk, permukaan, tepi, warna, dan morfologi sel.

Pewarnaan Gram

Karakterisasi morfologi sel dilakukan dengan cara pewarnaan Gram. Pada proses pewarnaan menggunakan 4 jenis larutan, yaitu kristal violet sebagai pewarna utama, iodin sebagai larutan penguat, alkohol sebagai peluntur, dan safranin sebagai pewarna tanding. Proses pewarnaan Gram diawali dengan pemberian kristal violet selama 1 menit, kemudian dilanjutkan dengan pemberian iodin selama 1 menit, alkohol selama 5 detik, dan safranin selama 45 detik. Bakteri Gram positif ditandai dengan gambaran sel berwarna biru atau keunguan, dan Gram negatif ditandai dengan gambaran sel berwarna merah (Hadioetomo, 1993).

Produksi Metabolit Antimikroba dari Bakteri Endofit

Produksi metabolit antimikroba dilakukan dengan menumbuhkan bakteri endofit pada media *Nutrient Broth* (NB). Pada 37 isolat yang diremajakan, diambil masing-masing 1 ose dan diinokulasikan ke dalam 10 mL media NB. Proses inkubasi biakan bakteri endofit pada media NB dilakukan selama 3 hari pada suhu 37 °C, kemudian larutan biakan tersebut disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C, sehingga didapatkan supernatan. Setelah selesai, supernatan diuji dengan metode difusi cakram untuk uji terhadap bakteri patogen.

Pembuatan Larutan McFarland 0,5 dan Pembuatan Suspensi Bakteri Uji *Propiobacterium acnes*

Pembuatan larutan McFarland 0,5 dilakukan dengan cara mencampurkan 0,05 mL barium klorida 1% ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dan 9,95 mL asam sulfat 1% (H_2SO_4) (Andrews, 2001). Nilai absorbansi larutan standar harus berada di rentang 0,08 hingga 0,13. McFarland 0,5 setara dengan suspensi bakteri $1,5 \times 10^8$ (McFarland, 1907). Bakteri uji pada media agar darah diambil dengan jarum ose lalu disuspensikan ke dalam tabung berisi 2 mL larutan NaCl 0,9 % hingga didapat kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan McFarland 0,5 (McFarland, 1907).

Skrining Bakteri Endofit yang Berpotensi sebagai Antimikroba terhadap *Propiobacterium acnes*

Supernatan bakteri endofit dilakukan uji potensi antimikroba dengan menggunakan metode kertas cakram *Kirby Bauer*. Suspensi bakteri patogen disebar pada permukaan media agar darah dengan menggunakan metode apus. Supernatan bakteri endofit hasil homogenisasi kemudian disaring menggunakan kertas cakram dengan diameter 6 mm. Kertas cakram diletakkan di atas medium uji antimikroba (media agar darah) yang telah berisi suspensi bakteri patogen, lalu diinkubasi selama 42–72 jam pada suhu 37 °C (Marselia et al., 2015). Zona jernih yang terbentuk dan diukur diameternya untuk menilai respon hambatan pertumbuhan bakteri. Klasifikasi respon hambatan dapat dilihat pada tabel dibawah (Tabel 1).

Tabel 1. Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri (Coyle, 2005)

| Diameter zona hambat (mm) | Interpretasi |
|---------------------------|--------------|
| <10 | Tidak ada |
| 10–15 | Lemah |
| 16–20 | Sedang |
| >20 | Kuat |

Kontrol Positif dan Negatif

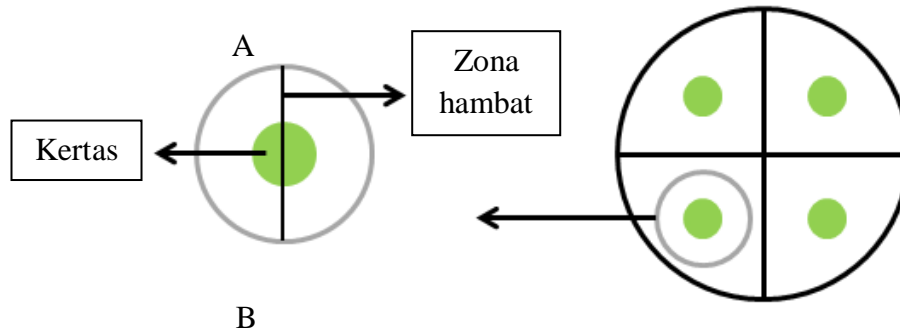
Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah obat klindamisin, sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah media NB (Tabel 2).

Tabel 2. Kriteria zona hambat antibiotik (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2016)

| Antimikroba | Konsentrasi cakram | Kriteria interpretasi diameter (mm) | | |
|-------------|--------------------|-------------------------------------|-------------------------|----------------------|
| | | <i>Susceptible</i> (S) | <i>Intermediate</i> (I) | <i>Resistant</i> (R) |
| Klindamisin | 2 µg | ≥21 | 16–20 | ≤15 |

Pengukuran Zona Hambat

Zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram kertas saring diukur menggunakan jangka sorong dalam satuan millimeter (mm) (Gambar 1). Pengukuran zona hambat dilakukan dari titik A ke titik B setelah diinkubasi selama 24 jam.

**Gambar 1.** Pengukuran zona hambat dan cara meletakkan kertas cakram

Identifikasi Bakteri Endofit *Centella asiatica* Potensial

Bakteri endofit dari daun tumbuhan *C. asiatica* yang memiliki aktivitas antimikroba tinggi, identifikasi dengan mengamati morfologi koloni, morfologi sel, dan karakter biokimia. Identifikasi dilakukan mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 2000).

Skrining Kandungan Metabolit Sekunder Bakteri Endofit

Bakteri endofit yang potensial diteliti kandungan metabolit sekundernya. Isolat yang diteliti diambil masing-masing 1 ose dan diinokulasikan ke dalam 10 mL media NB. Bakteri endofit pada media diinkubasi selama 3 hari pada suhu 37 °C, kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C. Setelah itu, supernatan yang diperoleh digunakan untuk uji metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, saponin, dan terpenoid dengan metode *Ciulei*.

HASIL

Karakterisasi Morfologi Bakteri Endofit Daun Pegagan

Isolat bakteri endofit daun pegagan sebanyak 37 isolat berhasil dilakukan peremajaan pada media NA. Isolat bakteri endofit daun pegagan tiap cawan petri memiliki karakteristik morfologi yang berbeda. Pada 37 isolat, dilakukan pewarnaan Gram dan didapati 20 isolat bakteri Gram negatif dan 17 isolat lainnya merupakan bakteri Gram positif. Hasil peremajaan isolat bakteri endofit berdasarkan pengamatan morfologi koloni dan morfologi sel (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil peremajaan bakteri endofit.

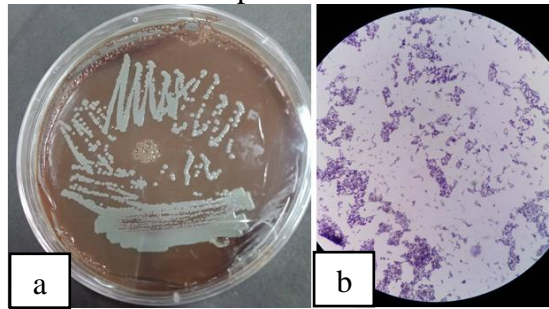
| Kode isolat | Bentuk | Morfologi koloni | | | Morfologi sel | Hasil pewarnaan Gram |
|-------------|-----------|------------------|--------------|------------------|---------------|----------------------|
| | | Permukaan | Tepi | Warna | | |
| 1. | Irregular | Datar | Bergelombang | Kuning | Basil | Positif |
| 2. | Irregular | Cembung | Bergelombang | Putih | Basil | Positif |
| 3. | Irregular | Cembung | Bergelombang | Putih kekuningan | Basil | Positif |
| 4. | Bulat | Datar | Bergerigi | Putih | Basil | Positif |
| 5. | Irregular | Datar | Bergelombang | Kuning | Basil | Positif |
| 6. | Irregular | Cembung | Bergerigi | Putih kekuningan | Basil | Positif |
| 7. | Bulat | Datar | Bergerigi | Putih | Basil | Positif |
| 8. | Titik | Datar | Utuh | Putih | Basil | Positif |

| Kode isolat | Bentuk | Morfologi koloni | | | Morfologi sel | Hasil pewarnaan Gram |
|-------------|-----------|------------------|--------------|------------------|---------------|----------------------|
| | | Permukaan | Tepi | Warna | | |
| 9. | Irregular | Cembung | Bergelombang | Putih kekuningan | Basil | Positif |
| 10. | Irregular | Cembung | Bergerigi | Putih | Basil | Negatif |
| 11. | Bulat | Datar | Bergerigi | Putih kekuningan | Basil | Positif |
| 12. | Irregular | Cembung | Bergelombang | Putih kekuningan | Basil | Negatif |
| 13. | Irregular | Cembung | Bergerigi | Putih | Basil | Positif |
| 14. | Irregular | Cembung | Bergelombang | Putih kekuningan | Basil | Negatif |
| 15. | Irregular | Cembung | Bergelombang | Putih kekuningan | Basil | Negatif |
| 16. | Bulat | Datar | Bergelombang | Putih | Basil | Positif |
| 17. | Irregular | Datar | Bergelombang | Putih kekuningan | Basil | Positif |
| 18. | Irregular | Cembung | Bergelombang | Putih | Basil | Negatif |
| 19. | Irregular | Datar | Bergerigi | Putih kekuningan | Basil | Negatif |
| 20. | Titik | Cembung | Utuh | Putih | Basil | Negatif |
| 21. | Irregular | Cembung | Bergelombang | Putih | Basil | Positif |
| 22. | Irregular | Datar | Bergerigi | Putih kekuningan | Basil | Positif |
| 23. | Irregular | Datar | Bergerigi | Putih kekuningan | Basil | Positif |
| 24. | Irregular | Datar | Bergelombang | Kuning | Basil | Positif |
| 25. | Irregular | Cembung | Bergelombang | Putih kekuningan | Basil | Negatif |
| 26. | Irregular | Cembung | Bergerigi | Putih kekuningan | Basil | Negatif |
| 27. | Irregular | Datar | Bergelombang | Putih kekuningan | Basil | Negatif |
| 28. | Bulat | Datar | Bergerigi | Putih | Basil | Negatif |
| 29. | Irregular | Cembung | Utuh | Putih | Basil | Negatif |
| 30. | Irregular | Cembung | Utuh | Putih kekuningan | Basil | Negatif |
| 31. | Bulat | Cembung | Bergelombang | Putih kekuningan | Basil | Negatif |
| 32. | Irreguler | Cembung | Utuh | Putih kekuningan | Basil | Negatif |
| 33. | Irregular | Datar | Bergelombang | Putih kekuningan | Basil | Negatif |
| 35. | Irregular | Cembung | Bergelombang | Kuning | Basil | Negatif |
| 36. | Titik | Cembung | Utuh | Putih | <i>Coccus</i> | Negatif |
| 37. | Irreguler | Cembung | Bergerigi | Putih kekuningan | <i>Coccus</i> | Negatif |

Peremajaan dan Konfirmasi Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan yaitu *P. acnes* yang diperoleh dari Departemen Parasitologi Universitas Indonesia. Hasil peremajaan bakteri ini pada media agar darah setelah inkubasi 48 jam menunjukkan morfologi koloni kecil, berbentuk bulat, mengkilat, tepi koloni rata, cembung, dan

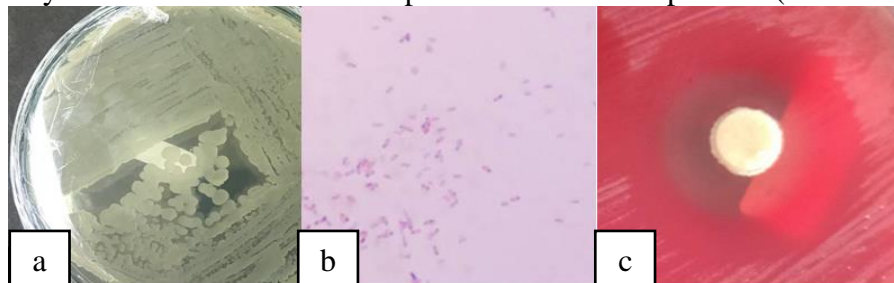
berwarna putih. Morfologi sel bakteri uji menunjukkan bakteri yang berbentuk basil, tidak beraturan dan merupakan bakteri Gram positif (Gambar 2). Data yang diperoleh dikonfirmasi dengan manual, sehingga diyakini bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri *P. acnes*.



Gambar 2. Morfologi koloni *Propionibacterium acnes* pada media agar darah usia 48 jam (a) dan morfologi sel *P.acnes* perbesaran 1000x (b)

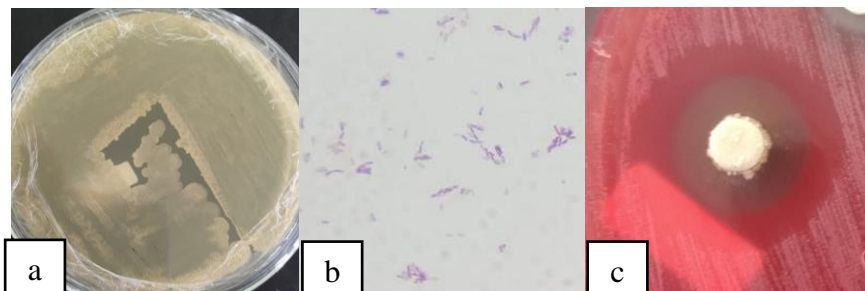
Skrining Bakteri Endofit Daun Pegagan yang Berpotensi sebagai Antimikroba terhadap *Propionibacterium acnes*

Hasil pengujian bakteri endofit sebagai antimikroba menggunakan metode difusi cakram menunjukkan bahwa beberapa isolat memiliki aktivitas antimikroba terhadap *P. acnes*. Zona hambat yang terbentuk berkisar antara 11,46–25,34 mm. Isolat bakteri endofit daun pegagan yang memiliki zona hambat terbesar, yaitu isolat 3 dengan diameter sebesar 25,34 mm. Isolat 3 memiliki ciri koloni berbentuk irregular, cembung, tepi bergelombang, dan berwarna putih kekuningan. Morfologi sel isolatnya berbentuk basil dan merupakan bakteri Gram positif. (Gambar 3).



Gambar 3. Morfologi koloni isolat 3 pada media NA usia 24 jam (a), morfologi sel isolat 3 perbesaran 1000x (b), dan zona hambat 3 yang terbentuk pada media agar darah usia 48 jam (c)

Isolat 17 juga mempunyai zona hambat yang besar dengan diameter sebesar 24,84 mm. Isolat 17 memiliki ciri koloni berbentuk irregular, cembung, tepi bergelombang, dan berwarna putih kekuningan. Morfologi sel isolat ini berbentuk basil dan merupakan bakteri Gram positif. (Gambar 4).

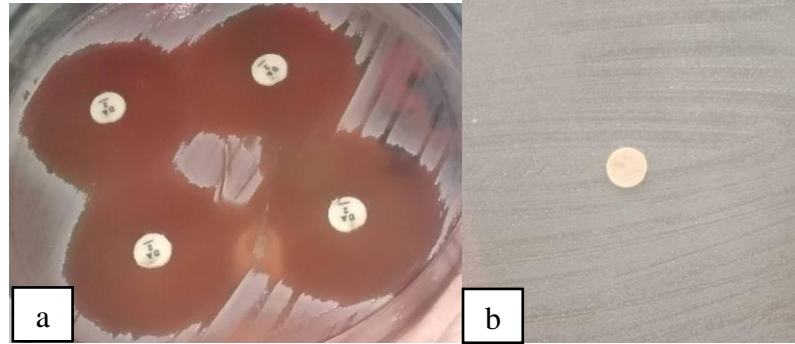


Gambar 4. Morfologi koloni isolat 17 pada media NA usia 24 jam (a), morfologi sel isolat 17 perbesaran 1000x (b), dan zona hambat 17 yang terbentuk pada media agar darah usia 48 jam (c)

Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Pada penelitian ini, kontrol positif yang digunakan adalah klindamisin, sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah media NB sebagai pembanding. Klindamisin menghasilkan zona

hambat sebesar 28,876 mm dan kontrol negatif dari NB tidak menghasilkan zona hambat (Gambar 5).



Gambar 5. Kontrol positif klindamisin pada media agar darah usia 48 jam (a) dan kontrol negatif NB pada media agar darah usia 48 jam (b)

Hasil Uji Biokimia Bakteri Endofit yang Potensial sebagai Antimikroba

Pengujian biokimia yang dilakukan terhadap dua isolat potensial (isolat 3 dan 17), yaitu uji kebutuhan oksigen, uji motilitas, uji glukosa, uji laktosa, uji manitol, uji maltosa, uji sukrosa, uji indol, uji simon sitrat, uji oksidase, uji katalase, dan uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA). Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan, diperoleh bahwa isolat bakteri endofit yang memiliki aktivitas antimikroba terhadap *P. acnes*, yaitu isolat 3 dan 17 memiliki kemiripan dengan genus *Aeromicrobium* (Tabel 4).

Tabel 4. Hasil uji biokimia bakteri endofit yang memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Propionibacterium acnes*

| Identifikasi isolat | 3 | 17 | <i>Aeromicrobium</i> |
|---------------------|-------|-------|----------------------|
| Kebutuhan oksigen | Aerob | Aerob | Aerob |
| Oksidase | + | + | +/- |
| Katalase | + | + | + |
| Glukosa | + | + | + |
| Laktosa | - | - | +/- |
| Manitol | + | + | +/- |
| Maltosa | - | - | - |
| Sukrosa | + | + | + |
| Urease | + | + | D |
| Indol | - | - | - |
| Motilitas | - | - | - |
| H ₂ S | - | - | - |
| TSIA | K/A | K/A | D |

Keterangan: D= positif kuat; K/A= fermentasi laktosa negatif dan fermentasi glukosa positif

Hasil Uji Metabolit Sekunder Bakteri Endofit yang Potensial sebagai Antimikroba

Uji metabolit sekunder dilakukan terhadap supernatan bakteri endofit yang potensial, yaitu isolat 3 dan 17. Uji ini dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan bakteri endofit pada daun pegagan. Bakteri endofit daun pegagan isolat 3 dan 17 dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid, saponin, dan terpenoid (Tabel 5).

Tabel 5. Hasil uji senyawa metabolit sekunder bakteri endofit daun pegagan (*Centella asiatica* L.)

| Senyawa metabolit sekunder | NB | 3 | 17 |
|----------------------------|----|---|----|
| Alkaloid | - | + | + |
| Flavonoid | - | - | - |
| Saponin | - | + | + |
| Terpenoid | - | + | + |

PEMBAHASAN

Peremajaan Bakteri Endofit

Peremajaan isolat bakteri endofit daun pegagan (*Centella asiatica* L.) dilakukan pada media NA. Setelah disubkultur selama 1–2 hari didapatkan 37 isolat bakteri endofit daun pegagan yang nantinya akan dikarakterisasi berdasarkan morfologi koloni dan morfologi sel. Tujuan dari subkultur ini untuk menumbuhkan kembali isolat-isolat bakteri yang disimpan di dalam tabung reaksi ke media NA dengan metode cawan gores.

Setelah diremajakan, bakteri endofit dikarakterisasi berdasarkan morfologi koloni dan morfologi sel. Morfologi koloni dilakukan dengan melihat secara makroskopik dari bentuk, permukaan, tepi serta warna. Sedangkan morfologi sel dilakukan dengan cara pewarnaan Gram yang didapatkan sebanyak 20 bakteri endofit berupa Gram negatif dan 17 bakteri Gram positif.

Peremajaan Bakteri Uji *Propionibacterium acnes*

Sebelum melakukan pengujian, bakteri *P. acnes* diremajakan selama 48-72 jam, bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri uji yang digunakan adalah bakteri uji murni tanpa adanya kontaminasi, dilanjutkan dengan pengamatan bakteri uji secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil pengamatan morfologi koloni, yaitu koloni berukuran kecil, berbentuk bulat, mengilat, tepi koloni utuh, cembung, berwarna putih, konsistensi padat. Hasil ini sesuai dengan penelitian Guay (2007) menyatakan bahwa sel bakteri *P. acnes* merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang tak beraturan. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa bakteri yang teridentifikasi adalah bakteri *P. acnes*.

Skrining Bakteri Endofit Daun Pegagan yang Berpotensi sebagai Antimikroba terhadap *Propionibacterium acnes*

Isolat bakteri endofit yang berhasil dimurnikan, kemudian diinokulasikan ke media NB. *Skrining* bakteri endofit daun pegagan yang berpotensi sebagai antimikroba terhadap *P. acnes* menggunakan media cair karena lebih efektif untuk memproduksi biomassa dan senyawa bioaktif dibandingkan dengan media padat. Proses ini dilakukan pada suhu ruang selama 72 jam karena pada waktu tersebut, bakteri tumbuh pada fase stasioner. Fase stasioner merupakan saat laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya. Keseimbangan jumlah keseluruhan bakteri ini terjadi karena adanya pengurangan derajat pembelahan sel. Hal ini disebabkan oleh kadar nutrisi yang berkurang dan terjadi akumulasi produk toksik, sehingga mengganggu pembelahan sel. Fase pertumbuhan stasioner merupakan fase bakteri endofit menghasilkan metabolit sekunder. Metabolit yang dihasilkan oleh kompetisi bakteri untuk memperoleh nutrisi yang terdapat pada media NB dengan tujuan sebagai pertahanan sehingga bakteri masing-masing menghasilkan senyawa metabolitnya (Fitriyah et al., 2009; Pratiwi, 2008).

Uji aktivitas antimikroba pada penelitian ini menggunakan metode difusi cakram. Hasil daya uji antimikroba didasarkan pada pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri yang terbentuk di sekeliling kertas cakram menggunakan jangka sorong. Metode ini digunakan untuk menentukan kemampuan aktivitas antimikroba dengan cara supernatan bakteri endofit daun pegagan ditempatkan ke dalam kertas cakram. Hal ini sesuai dengan literatur yang ada bahwa zona hambat yang terbentuk pada media yang telah diinokulasi bakteri di sekitar kertas cakram yang dicelupkan sampel menunjukkan aktivitas penghambatan (Mulyadi et al., 2017).

Isolat bakteri yang paling berpotensi adalah bakteri yang mempunyai zona hambat terbesar, yaitu 3 sebesar 23,34 mm dan 17 sebesar 24,84 mm. Berdasarkan klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri, kedua isolat bakteri endofit daun pegagan tersebut termasuk ke dalam interpretasi kuat (Coyle, 2005). Hasil daya hambat kedua isolat tersebut memiliki hasil yang terinterpretasi kuat, sama dengan kontrol positif yang memiliki diameter zona hambat 28,876 cm yang terinterpretasi kuat.

Kontrol negatif yang digunakan adalah NB yang tidak mempunyai zona hambat. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol yang digunakan tidak berpengaruh pada uji antimikroba, sehingga daya hambat yang terbentuk tidak dipengaruhi oleh pelarut, melainkan karena aktivitas senyawa isolat bakteri endofit daun pegagan. Hal ini sesuai dengan literatur yang ada bahwa kontrol negatif

digunakan sebagai pembanding dan pelarut yang tidak menunjukkan adanya zona hambat pada pengujian, sehingga daya hambat yang terbentuk tidak dipengaruhi oleh pelarut (Kumayas et al., 2015).

Identifikasi Bakteri Endofit yang Potensial

Identifikasi isolat bakteri endofit daun pegagan yang memiliki aktivitas antimikroba terhadap *P. acnes* setelah dilakukan pengamatan morfologi koloni, morfologi sel, dan uji biokimia, didapatkan hasil, yaitu isolat 3 dan 17 yang memiliki karakteristik yang mirip dengan genus *Aeromicrobium*, menurut buku kunci determinasi dari *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 2000), serta penelitian Cui et al. (2007). Perbandingan karakteristik biokimia tersebut dapat dilihat pada Tabel 5.

Bakteri *Aeromicrobium* adalah bakteri Gram positif berbentuk batang, tidak berspora, bakteri aerob, dan habitatnya tersebar di tanah (Cui et al., 2007). Bakteri endofit *Aeromicrobium* ini juga pernah diisolasi dari jahe dan *Vochysia divergens* (Cui et al., 2007; Singh & Dubey, 2018).

Identifikasi Metabolit Sekunder

Isolat 3 dan 17 setelah dilakukan pengujian metabolit sekunder didapatkan hasil metabolit sekunder berupa alkaloid, terpenoid, dan saponin. Pada penelitian sebelumnya diketahui *Aeromicrobium* mempunyai metabolit sekunder berupa alkaloid (Singh & Dubey, 2018). Alkaloid berpotensi sebagai sumber obat yang berlimpah dan berefek farmakologis beragam serta memiliki kemampuan sebagai zat antimikroba dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Saifudin, 2014).

Bakteri endofit daun pegagan juga mempunyai metabolit sekunder berupa terpenoid dan saponin. Terpenoid adalah senyawa yang tersusun dari kerangka isoprena (C₅), yakni lima rantai karbon bercabang (*branching*) metil pada karbon nomor 2 atau kelipatannya yang berperan sebagai antimikroba dengan cara menghambat proses terbentuknya membran atau dinding sel, sehingga tidak terbentuk (Brinkhaus et al., 2000; Saifudin, 2014). Saponin bekerja sebagai antimikroba dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri, sehingga menyebabkan sel bakteriolisis. Mekanisme kerja saponin termasuk dalam kelompok antimikroba yang mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri, yaitu protein, asam nukleat, dan nukleotida. Hal ini akhirnya mengakibatkan sel bakteri mengalami lisis (Nugrahani et al., 2016).

Antimikroba yang dapat dihasilkan oleh bakteri endofit yaitu bakteri endofit yang berasal dari ginseng merupakan spesies *Aeromicrobium erythreum* yang dapat menghasilkan eritromisin (Cui et al., 2007). Antimikroba eritromisin merupakan satu di antaranya dari golongan antibiotik makrolida yang bekerja bakteriostatik terhadap bakteri gram positif dan spektrum kerjanya mirip penisilin-G. Eritromisin bekerja dengan menghambat pertumbuhan *P. acnes* dengan cara mengikat secara ireversibel pada subunit ribosom 50S untuk menghambat sintesis protein (Keri & Shiman, 2009).

SIMPULAN DAN SARAN

Bakteri endofit daun pegagan (*Centella asiatica* L.) memiliki potensi sebagai antimikroba terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Identifikasi karakter bakteri endofit yang memiliki potensi sebagai antimikroba paling potensial, yaitu isolat 3 dan 17. Berdasarkan morfologi koloni, morfologi sel, dan uji biokimia memiliki kemiripan dengan genus *Aeromicrobium*. Identifikasi senyawa metabolit yang dapat dihasilkan bakteri endofit yaitu senyawa golongan alkaloid, terpenoid, dan saponin. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan mengenai kadar senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan bakteri endofit.

REFERENSI

Achermann, Y., Goldstein, E. J. C., Coenye, T., & Shirliffa, M. E. (2014). *Propionibacterium acnes*: From commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 419-440. doi: 10.1128/CMR.00092-13.

- Adityawarman., Mahyarudin., & Effiana. (2019). Isolasi, identifikasi dan aktivitas antimikroba bakteri endofit daun pegagan (*Centella asiatica* L.) terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Cerebellum*, 5(4b), 1569-1582.
- Akbar, M. R. V., & Budiarti, L. Y. (2016). Perbandingan efektivitas antibakteri antara ekstrak metanol kulit batang kasturi dengan ampisilin terhadap *Staphylococcus aureus in vitro*. *Jurnal Berkala Kedokteran*, 12(1), 1-9.
- Aksara, R., Musa, W. J. A., & Alio, L. (2013). Identifikasi senyawa alkaloid dari ekstrak metanol kulit batang mangga (*Mangifera indica* L.). *Jurnal Entropi*, 8(1), 514-519.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), 5-16.
- Brackman, G., & Coenye, T. (2015). Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 5-11.
- Brinkhaus, B., Lindner, M., Schuppan, D., & Hahn, E. (2000). Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medicinal plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine*, 7(5), 427-448.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2016). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 26th ed.* USA: CLSI supplement M100S.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins a viable alternative to antibiotics?. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 95-105.
- Coyle, M. B. (2005). *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. Washington: American Society for Microbiology.
- Cui, Y., Im, W., Yin, C., Lee, J., Lee, K. C., & Lee, S. (2007). *Aeromicrobium panaciterrae* sp. nov isolated from soil of a ginseng field in South Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(1), 689-691.
- Faisal, I. A., Handini, M., & Mahyarudin. (2018). Aktivitas *quorum quenching* bakteri gram positif endofit tanaman pegagan (*Centella asiatica*) terhadap *Chromobacterium violaceum* (Skripsi sarjana). Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Indonesia.
- Fitriyah, D., Jose, C., & Saryono. (2009). *Skrining* aktivitas antimikroba dan uji fitokimia dari kapang endofitik tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*). *Journal Indonesia Chemica Acta*, 3(2), 128-313.
- Guan, S., Sttler, I., Lin, W., Guo, D., & Grabley, S. (2005). P-aminoacetophenonic acids produced by a mangrove endophyte: *Streptomyces griseus* subsp. *Journal of Natural Products*, 68(8), 1198-1200.
- Guay, D. (2007). Topical clindamycin in the management of acne vulgaris. *Expert Opin Pharmacother*, 8(15), 2625-2664.
- Hadioetomo, R. S. (1993). *Mikrobiologi dasar dalam praktek*. Jakarta: Gramedia.
- Hamid, A. A., Shah, Z. M., Muse, R., & Mohamed, S. (2002). Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. *Food Chemistry*, 77(4), 465-469.
- Hidayat, M., Mufidah., Herlina, R. (2018). Isolasi dan karakteristik molekular mikroba endofit tanaman pegagan (*Centella asiatica* L.) sebagai penghasil antimikroba. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 22(2), 56-60.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., & Williams, S. (2000). *Bergey's of determinative bacteriology 9th ed.* USA: A Wolters Kluwer Company Philadelphia.
- Jagtap, N. S., Khadabadi, S. S., Ghorpade, D. S., Banarase, N. B., & Naphade, S. S. (2009). Antimicrobial and antifungal activity of *Centella asiatica* (L.) Urban, Umbeliferae. *Research Journal Pharmacy and Technology*, 2(2), 328-330.
- Keri, J., & Shiman, M. (2009). An update on the management of acne vulgaris. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 105-110.
- Kim, J. E., Park, A. Y., Lee, S. Y., Park, Y. L., Whang, K. U., & Kim, H. J. (2018). Comparison of the efficacy of azithromycin versus doxycycline in acne vulgaris: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of Dermatology*, 30(4), 417-426.
- Kumayas, A. R., Wewengkang, D. S., & Sudewi, S. (2015). Aktifitas antimikroba dan karateristik

- gugus fungsi dari tunikata *Polycarpa aurata*. *Pharmakon Jurnal Ilmiah Farmasi*, 4(1), 32-44.
- Kusumawati, D. E., Pasaribu, F. H., & Bintang, M. (2014). Aktivitas antimikroba isolat bakteri endofit dari tanaman miana (*Coleus scutellariodes* (L.) Benth.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Current Biochemistry*, 1(1), 45-50.
- Marselia, S., Wibowo, M. A., & Arreneuz, S. (2015). Aktivitas antimikroba ekstrak daun soma (*Ploiarium alternifolium* Melch) terhadap *Propionibacterium acnes*. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 4(4), 72-82.
- McFarland, J. (1907). Nephelometer: An instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *The Journal of American Medical Association*, 14(1), 1176-1178.
- Mulyadi, M., Wuryanti, & Sarjono, P. R. (2017). Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) kadar sampel alang-alang (*Imperata cylindrica*) dalam etanol melalui metode difusi cakram. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 20(3), 130-135.
- Muzdalifah, N., & Adi, K. (2016). Identifikasi jenis jerawat dengan *wavelet Haar* dan jaringan syaraf tiruan propagasi balik. *Youngster Physics Journal*, 5(4), 171-178.
- Nugrahani, R., Andayani, Y., & Hakim, A. (2016). *Skrining* fitokimia dari ekstrak buah buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) dalam sediaan serbuk. *Jurnal Pendidikan IPA*, 2(1), 97-103.
- Nur, A. H., Mahyarudin., Handini, M., Rialita A., & Mardhia. (2018). Pengamatan potensi bakteri gram negatif endofit tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang memiliki kemampuan *quorum quenching*. Pontianak: Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura.
- Pee, K. H. (2012). Biosynthesis of halogenated alkaloids. *ScienceDirect*, 71(1), 167-210.
- Prasetyoputri, A. (2011). Mikroba endofit sumber acuan baru yang berpotensi. *Mikrob*, 2(1), 3-5.
- Pratiwi, S. T. (2008). *Mikrobiologi farmasi*. Yogyakarta: Eirlangga.
- Saifudin, A. (2014). *Senyawa alam metabolit sekunder 1st ed*. Yogyakarta: Deepublish.
- Singh, R., & Dubey, A. K. (2018). Diversity and applications of endophytic actinobacteria of plants in special and other ecological niches. *Frontiers in Microbiology*, 9(1), 1-30.
- Strobel, G. D. B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 67(4), 491-502.
- Zaenglein, A. L., Pathy, A. L., Schlosser, B. J., Alikhan, A., Baldwin, H. E., Berson, D. S., & Bhushan, R. (2016). Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(5), 945-973.