

ISOLASI BAKTERI ENDOFIT BATANG DAN DAUN KETAPANG (*Terminalia catappa*) SERTA UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA

Miftahur Rahmi,^{1,2)} Diza Sartika,²⁾ Feliani Marta Putri,²⁾

¹UIN Sulthan Thaha Saifuddin Jambi

²Universitas Perintis Indonesia

Email: miftahur.rahmi99@gmail.com

Detail Artikel

Diterima : 25 November 2023
Direvisi : 5 Desember 2023
Diterbitkan : 5 Desember 2023

Kata Kunci

Bakteri Endofit
Terminalia catappa
Antimikroba

Penulis Korespondensi

Name : Miftahur Rahmi
Affiliation : UIN Sulthan Thaha
Saifuddin Jambi
E-mail : miftahur.rahmi99@gmail.com

ABSTRACT

*The use of antibiotics in controlling disease in humans has been widely reported to cause negative impacts such as microbial resistance and allergic reactions. Therefore, other control alternatives that are friendlier and safer are needed. Endophytic bacteria have been widely used as biocontrol agents for various diseases because they are known as a source of producing compounds that have antimicrobial properties. The Ketapang plant (*Terminalia catappa*) is known to have antibacterial activity against several disease-causing pathogens. This research was conducted with the aim of determining the antimicrobial potential of compounds produced by endophytic bacteria of the Ketapang plant in suppressing the growth of pathogens that cause disease in humans, represented by *S.aureus* from gram-positive bacteria, *E.colli* from gram-negative bacteria, and *C.albicans* from fungal group. The experiment was carried out using the Kirby Bauer method by looking at the inhibition zone produced by endophytic bacteria to suppress the growth of*

*pathogens. The test results showed that 2 isolates of endophytic bacteria BK II and BK IV had the best ability to inhibit the pathogen *Staphylococcus aureus* with an inhibitory power of 6.21 mm and 8.23 mm respectively but had no inhibitory power against *E.colli* and *C.albicans* . Microscopic observations show that the compounds released by these endophytic bacterial isolates can cause malformations in *S.aureus*. It is hoped that the endophytic bacterial isolates obtained can be developed as a source of new antibiotics*

ABSTRAK

Penggunaan antibiotik dalam mengendalikan penyakit pada manusia telah banyak dilaporkan menimbulkan dampak negatif seperti resistensi mikroba dan reaksi alergi. Oleh karena itu diperlukan alternatif pengendalian lain yang lebih ramah dan aman. Bakteri endofit telah banyak dimanfaatkan sebagai agens biokontrol pada berbagai penyakit karena dikenal sebagai sumber penghasil senyawa-senyawa yang bersifat antimikroba. Tanaman Ketapang (*Terminalia catappa*) diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa patogen penyebab penyakit dan kemungkinan bakteri endofitnya juga bisa menghasilkan senyawa antimikroba. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui potensi antimikroba dari senyawa yang dihasilkan oleh bakteri endofit tanaman ketapang dalam menekan pertumbuhan patogen penyebab penyakit pada manusia yang diwakili oleh *S.aureus* dari bakteri gram positif, *E.colli* dari bakteri gram negatif, dan *C.albicans* dari golongan jamur. Percobaan dilakukan dengan metode kirby bauer dengan melihat zona hambat yang dihasilkan bakteri endofit dalam menekan pertumbuhan patogen, sekaligus sebagai sumber antibiotik baru. Hasil pengujian menunjukkan terdapat 2 isolat bakteri endofit BK II dan BK IV memiliki kemampuan terbaik dalam menghambat patogen *Staphylococcus aureus* dengan daya hambat masing-masing sebesar 6,21 mm dan 8,23 mm namun tidak memiliki daya hambat terhadap *E.colli* dan *C.albicans*. Pengamatan mikroskopis memperlihatkan bahwa senyawa yang dikeluarkan oleh isolat-isolat bakteri endofit tersebut dapat menyebabkan terjadinya malformasi pada *S.aureus*. Diharapkan isolat bakteri endofit yang diperoleh bisa dikembangkan sebagai sumber antibiotik baru.

PENDAHULUAN

Tumbuhan mangrove mengandung banyak manfaat untuk kehidupan manusia. Selain memiliki manfaat ekologi dan sebagai sumber makanan, tumbuhan mangrove juga bermanfaat sebagai antibakteri. Salah satu tumbuhan mangrove yang berfungsi sebagai antibakteri adalah tumbuhan ketapang (*Terminalia catappa*) (Leonardo, 2019).

Ketapang banyak tumbuh di pantai yang kawasan penyebarannya cukup luas. Selain berfungsi sebagai antibakteri, ketapang (*Terminalia catappa*) dapat digunakan sebagai obat diabetes melitus, dermatitis, antimikroba dan antijamur, antiinflamasi, dan anti malaria. Ketapang diketahui mengandung senyawa kimia seperti alkaloid, terpen, glikosida, dan tanin (Leonardo, 2019)

Hasil penelitian Lele tahun 2020 mengatakan bahwa senyawa alkaloid pada ketapang memiliki fungsi sebagai penghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif. Umumnya pemanfaatan senyawa bioaktif dari suatu tanaman obat diperoleh dengan cara mengekstrak bagian dari tanaman tersebut namun cara ini kurang efektif karena membutuhkan banyak jumlah bagian dari tanaman untuk di ekstrak dan apabila perlakuan ini dilakukan secara terus menerus akan mengakibatkan ketersediaan tanaman di lingkungan akan berkurang atau menurun. Cara lain yang lebih efektif untuk memperoleh senyawa bioaktif dari tanaman tersebut adalah dengan memanfaatkan bakteri endofit.

Bakteri endofit adalah mikroorganisme menguntungkan yang hidup dan berinteraksi dengan tanaman inang tanpa menyebabkan gangguan atau kerusakan pada tanaman tersebut (Rhamadhanty, 2021). Simbiosis yang akan terbentuk antara tanaman inang dengan bakteri endofit adalah simbiosis mutualisme dimana bakteri endofit membutuhkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman untuk hidup. Sedangkan tanaman inang yang ditumpanginya oleh bakteri endofit mendapat manfaat berupa memacu pertumbuhan tanaman karena bakteri endofit mampu menghasilkan hormon pertumbuhan dan juga mampu meningkatkan resistensi terhadap berbagai macam mikroba patogen dengan cara menginduksi ketahanan tanamanehingga mampu bertahan terhadap penyakit tanaman.

Bakteri endofit mampu menghasilkan senyawa bioaktif seperti tanaman inang karena adanya pertukaran genetik antara bakteri endofit dengan tanaman inangnya, sehingga potensi tumbuhan sebagai antimikroba tidak hanya melalui senyawa bioaktif yang terkandung dalam tumbuhan melainkan dapat melalui mikroba endofit yang hidup di dalamnya (Ramadhanty et al., 2021). Antimikroba merupakan suatu zat-zat kimi yang dibentuk dan dihasilkan oleh mikroorganisme yang mana zat tersebut mempunyai daya hambat aktifitas mikroorganisme lain meskipun dalam jumlah yang sedikit (Febriani et al., 2021).

Penelitian mengenai aktivitas antimikroba dari ekstrak etanol daun ketapang memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 50%, 75%, dan 100% memiliki daya hambat yang tinggi (Leonardo, 2019). Berdasarkan penjelasan di atas, maka peneliti ingin mengisolasi bakteri endofit dan menguji aktivitas antimikroba dari batang dan daun ketapang.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan April-Juni bertempat Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Universitas Andalas, dan Balai Besar Penelitian Veteriner Baso, Agam.

Alat dan Bahan

Alat

Erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *beaker glass*, batang pengaduk, pipet tetes, kertas saring, kaca objek, *cover glass*, pisau, cawan petri, jarum ose, pinset, bunsen, lemari pendingin, *laminar air flow*, autoklaf, oven, inkubator, mikrotube, pipet mikro, tip, jangka sorong, kertas label, kertas koran, kompor, mikroskop cahaya dan mikroskop elektron.

Bahan

Sampel batang dan daun mangrove *Terminalia catappa*., bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, jamur *Candida albicans*, aquadest steril, Alkohol 96%, Alkohol 70%, NaCl 0.9%, larutan BaCl₂·2H₂O 1,175%, Larutan H₂SO₄ 1%, Natrium hipoklorit 5.25 %, iodine, fuksin, media *Nutrient Agar*, media *Nutrient Broth*, media PDA, larutan kristal

violet, disk gentamicin, lugol, larutan safranin, minyak emersi, pereaksi indol, pereaksi MR (*Methyl Red*), pereaksi KOH dan *Alfa-Naphtol*, pereaksi larutan A dan B, dan pereaksi *paraffin*.

Prosedur Kerja

1. Pengambilan Sampel

Terminalia catappa diperoleh dari daerah Pantai Jambak, Jalan Teratai, Pasie Nan Tigo, Kecamatan Koto Tangah, Kota Padang Sumatera Barat

2. Identifikasi Sampel

Identifikasi tanaman dilakukan untuk memastikan jenis tanaman yang digunakan untuk penelitian. Sampel *Terminalia catappa* diidentifikasi di Herbarium Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Andalas, Padang.

3. Desinfeksi Permukaan Batang dan Daun *Terminalia catappa*.

Sampel dari batang dan daun *Terminalia catappa*. dalam kondisi segar dicuci dengan air mengalir hingga bersih lalu sampel dipotong dengan ukuran 3 cm. Selanjutnya dilakukan proses sterilisasi permukaan dengan cara direndam menggunakan larutan alkohol 2 ml 70% selama 30 detik, Natrium hipoklorit 5.25% selama 30 detik, dan terakhir dengan larutan 2 ml alkohol 70% selama 30 detik. Setelah itu sampel *Terminalia catappa*. dibilas dengan air steril dua kali masing-masing satu menit untuk menghilangkan kotoran, maupun organisme epifit yang menempel pada permukaannya. Sampel kemudian dikeringkan diatas tisu steril

4. Sterilisasi Alat dan Pembuatan Media Kultur Bakteri.

Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu hingga bersih dan dikeringkan. Cawan petri di bungkus dengan koran, tabung reaksi dan pipet tetes di tutup lubangnya dengan kapas dan kasa lalu di bungkus satu persatu dengan kertas koran. Alat yang digunakan disterilkan dalam oven pada suhu 160°C selama 1 jam, lubang Erlenmeyer dan gelas ukur ditutup dengan kapas dan kasa dan di bungkus satu persatu dengan kertas koran lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit tekanan 15 lbs. Pinset, jarum ose, dan kaca objek disterilkan dengan cara dibakar menggunakan lampu spritus.

Pembuatan Nutrient Agar

Media NA sebanyak 28 gram dilarutkan ke dalam 1 liter akuades kemudian diaduk dan dipanaskan menggunakan *hot plate magnetic stirrer*. Setelah itu dimasukkan ke Erlenmeyer dan ditutup dengan kapas kemudian disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah steril, media langsung dituang ke cawan petri pada suhu 45⁰-50⁰C.

Pembuatan Media PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Sebanyak 200g kentang dibersihkan lalu dipotong dadu 1x1 cm, lalu direbus didalam 500 ml aquades sampai mendidih atau sampai warna airnya kekuningan. Kemudian hasil dari rebusan kentang tersebut di saring untuk mendapatkan air ekstrak kentang kemudian diamkan sampai dingin. Seteleh itu air ekstrak kentang ditambah dengan aquades sampai larutan menjadi 1000 ml, ditambahkan dekstrose atau gula pasir 20 gr dan agar 20 gr, kemudian di rebus kembali sampai mendidih. Pada saat perebusan, larutan tersebut di aduk supaya tidak

terjadi penggumpalan. Media PDA dalam cawan petri tersebut kemudian di sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media PDA yang telah di sterilisasi kemudian didinginkan. (Sumitro et al., 2022).

5. Isolasi dan Pemurnian Bakteri Endofit

Sampel yang telah disterilkan ditanam di dalam media agar NA. Media di dalam cawan petri yang sudah ditanami sampel batang dan daun *Terminalia catappa* diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 2x24 jam diamati hingga terdapat koloni yang tumbuh (Desriani et al., 2013). Setelah isolat tumbuh, dilakukan pemurnian terhadap bakteri yang diperoleh. Pemurnian dilakukan dengan memindahkan koloni yang tumbuh ke cawan petri yang berisi NA baru. Selanjutnya pemurnian dilakukan dengan metode kuadran (Ismail et al., 2010). Metode kuadran dilakukan dengan cara membagi wilayah pada cawan petri menjadi 4 bagian. Kemudian diinokulasikan isolat bakteri endofit pada daerah 1 yang merupakan goresan awal yang mengandung banyak isolat bakteri endofit. Goresan selanjutnya disilangkan atau dilanjutkan dari goresan pertama ke daerah selanjutnya sehingga jumlah bakteri endofit semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal.

Isolat bakteri endofit dari masing-masing sampel diambil dengan jarum ose kemudian dipindahkan kedalam media NA miring sehingga didapatkan islat yang siap digunakan dan untuk daun diberi label DK, sementara untuk batang diberi kode BK.

6. Identifikasi Bakteri Endofit

Pengamatan Morfologi

Pengamatan makroskopis yang dilakukan meliputi bentuk koloni (whole colony) dan bentuk yang tampak tanpa menggunakan mikroskop. Morfologi yang diamati meliputi warna, tepi, dan permukaan. Permukaan koloni (*elevation*) rata, timbul atau datar, melengkung, membukit, serupa kawah. Tepi koloni (*edge*) utuh, berombak berbelah bergerigi, berbenang, keriting. Warna koloni (*colour*) keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening (Rezekikasari & Harianto, 2019)

Pewarnaan Gram

Identifikasi bakteri uji endofit secara mikroskopis dilakukan dengan menggunakan pewarnaan Gram. Bakteri uji endofit standar pada agar miring diambil sebanyak satu ose diletakkan di atas kaca objek yang telah ditetesi dengan NaCl fisiologis. Sebarkan bakteri pada kaca objek dengan menggunakan ose bulat kemudian dilewatkan di atas api (difiksasi). Larutan violet ditetaskan diatas preparat yang telah disiapkan kemudian dibiarkan selama 1 menit. Preparat dicuci dengan akuades. Kemudian cairan lugol ditetaskan pada preparat dan dibiarkan selama 1 menit. Preparat dicuci dengan akuades, Preparat ditetaskan dengan alkohol 96%, digoyang-goyangkan selama 30 detik. Preparat dicuci dengan akuades. Terakhir, preparat ditetaskan dengan safranin dan dibiarkan selama 1 menit. Preparat dicuci dengan akuades dan dikeringkan dengan menggunakan tissue. Preparat ditetesi dengan minyak imersi dan diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 1000x

Identifikasi Biokimia

a. Uji Pembentukan H₂S

Diinokulasikan kultur isolat bakteri endofit yang mempunyai potensipenghambatan dengan jarum ose secara tusukan pada medium TSIA miring dan pada permukaan medium diinokulasikan secara goresan. Diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan uji H₂S ditunjukkan dengan terbentuknya endapan hitam yang berarti bakteri mampu menghasilkan senyawa desulfurase, selain itu dapat digunakan untuk mengamati fermentasi gula.

b. Uji motilitas

Uji motilitas digunakan untuk melihat pergerakan bakteri dalam media tumbuh. Biakan bakteri endofit batang dan daun diambil menggunakan jarum ose secara aseptik lalu diinokulasi pada media NA semisolid secara vertikal serta diinkubasi pada inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Motilitas bakteri dapat dilihat dengan adanya pertumbuhan pada permukaan medium dan tidak adanya bekas pada tusukan atau menyebar yaitu positif. Sementara apabila terdapatnya bakteri yang tumbuh pada permukaan medium yang ditusukan berarti negatif

c. Uji Indol

Uji indol digunakan untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri menghasilkan indol dengan menggunakan enzim tryptophanase. Produksi indol di dalam media dimungkinkan karena adanya tryptophan. Tryptophan adalah asam amino esensial, yang teroksidasi oleh beberapa bakteri yang mengakibatkan pembentukan indol, asam piruvat, dan ammonia (Liempepas et al., 2019).

d. Uji Urease

Uji Urease bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri mengubah urea menjadi amoniak. Media untuk uji urease menggunakan Urea Base Agar. (Liempepas et al., 2019)

e. Uji laktosa, glukosa, sukrosa dan mannitol

Uji ini berfungsi untuk mengetahui apakah bakteri dapat mendekarboksilase uji gula tersebut

f. Uji sitrat

Uji sitrat untuk mendeteksi kemampuan suatu organisme untuk memanfaatkan sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Jika bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya maka akan menaikkan pH dan mengubah warna medium biakan dari hijau menjadi biru.

g. Uji *Methyl Red* (MR)

Uji *Methyl Red* (MR) bertujuan untuk mendeteksi kemampuan organisme dalam memproduksi dan mempertahankan produk akhir asam stabil dari fermentasi glukosa. *Methyl red* adalah indikator pH, yang tetap berwarna merah pada pH 4,4 atau kurang.

h. Uji *Voges Proskauer* (VP)

Uji *Voges Proskauer* (VP) menggunakan media glukosa fosfat. Uji ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam membentuk asetil metil karbinol (asetoin) dari hasil fermentasi glukosa. Setelah diinkubasi, pada media ditambahkan naphthol 5% dan KOH 40%.

i. Uji Oksidasi-Fermentasi(OF)

Uji Oksidasi-Fermentasi (OF) dilakukan dengan membandingkan medium OF dengan atau tanpa paraffin yang diinokulasikan bakteri endofit terhadap media kontrolnya yang berwarna hijau. Inokulasi dilakukan dengan cara tusukan hingga dasar media OF. Setelah diinokulasi pada bakteri endofit, kemudian diinkubasi selama 24 jam.

j. Uji nitrat

Uji nitrat untuk menentukan kemampuan bakteri dalam mereduksi nitrat menjadi nitrit, dengan cara penambahan reagen 0,8% sulfanilic acid, 0,6% - naphthylamine dan serbuk zink kedalam medium *Nitrate broth* yang telah ditanami isolate

Pengujian Aktvitas Antimikroba

Pengujian kadar zona hambat dilakukan dengan metode Kirby Bauer (difusi kertas cakram) dengan bakteri uji adalah *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri gram positif, *Escherichia coli* sebagai bakteri gram negatif, dan *Candida albicans* dari jamur. Untuk kontrol positif yang digunakan yaitu gentamycin dan ketokonazol.

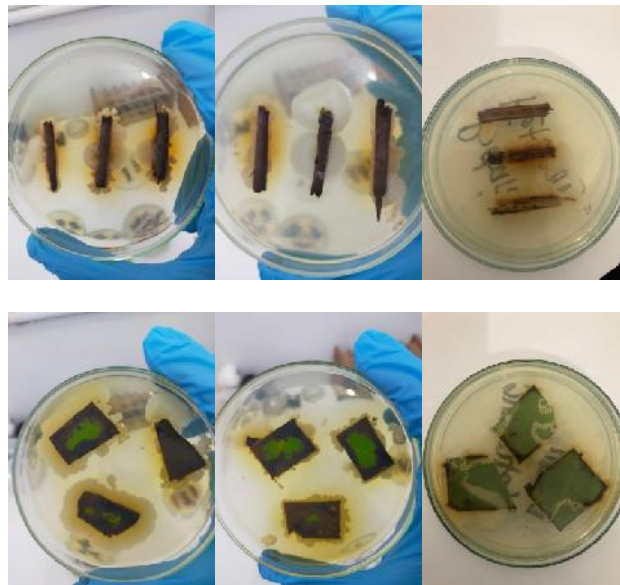
Suspensi mikroba uji tersebut dituangkan ke atas permukaan media NA dengan Metode *Pour Plate* (Aryani et al., 2020) Pembuatan suspensi bakteri uji dilakukan secara aseptis dengan cara koloni bakteri uji pada media peremajaan yang berumur 24 jam diambil 1-3 jarum ose dan disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 ml larutan NaCl steril 0,9% kemudian di vortex hingga homogen. Kekeruhan yang telah diperoleh kemudian disetarakan dengan standar Mc Farland 0,5% yaitu setara dengan jumlah kerapatan bakteri 1.5×10^8 CFU/mL. Suspensi *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans* tersebut dipipet sebanyak 100 μ L dan di swab ke media pembenihan. Media yang digunakan yaitu *Nutrient agar* untuk *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, sementara untuk jamur *Candida albicans* digunakan media *Potato Dextrose Agar* (PDA).

Pada penyiapan bakteri endofit dilakukan dengan mengambil isolat bakteri endofit dari masing-masing sampel diambil dengan jarum ose kemudian masing-masing diinokulasikan ke dalam 9 ml NaCl 0,9% kemudian di vortex hingga homogen, lalu dipipetkan menggunakan pipet mikron sebanyak 10 μ L.

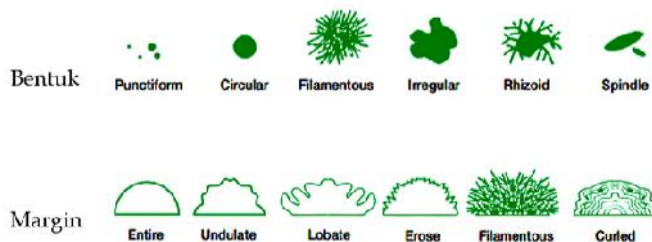
Media NA dan PDA yang berisi mikroba uji diinkubasi selama 24 jam. Permukaan media diletakkan 4 buah *paper disk* yang ditetesi dengan suspensi bakteri endofit dari sampel *Terminalia catappa* dan satu *paper disk* digunakan untuk kontrol positif. *Disk* gentamicin sebagai kontrol positif untuk bakteri, *disk* ketoconazole sebagai kontrol positif untuk jamur. Pada setiap cawan petri ditempatkan 4 *paper disk* dan diinokulasi dengan jarak yang sama antar *paper disk* secara teratur agar tidak terjadi *overlapping* zona hambat yang terbentuk. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Cawan petri diberi label pada dasar petri secara benar sesuai dengan nama isolat bakteri endofit yang telah diberikan dan bakteri uji diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Terbentuknya zona bening di sekeliling *paper disk* menunjukkan kemampuan bakteri endofit menghasikan antibiotik. Lebarnya zona bening diukur untuk mengetahui zona antibiotik yang dihasilkan.

Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri endofit dengan pengujian biokimia serta menghitung diameter daya hambatnya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan jamur *Candida albicans* dengan metode difusi cakram kertas. Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah batang dan daun mangrove ketapang (*Terminalia catappa*) yang di ambil dari kawasan Pantai Jambak , Jalan Teratai, Pasie Nan Tigo, Kecamatan Koto Tengah, Kota Padang Sumatera Barat. Setelah sampel mangrove ketapang diambil, dilanjutkan dengan pemeriksaan identifikasi tanaman yang dilakukan di herbarium ANDA dengan nomor identifikasi: 251/K-ID/ANDA/VI/2022 dan hasil dari pemeriksaan tersebut didapatkan nama sampel *Terminalia catappa L.* yang merupakan anggota family combretaceae, sesuai dengan sampel yang diinginkan. Sampel diambil 2 bagian tanaman yaitu batang dan daun dari ketapang untuk mengetahui bagian tanaman. Sampel yang telah dibersihkan kemudian dipotong sepanjang 3 cm dan ditanam menggunakan pinset steril secara aseptis ke dalam media Nutrient Agar (NA) dalam cawan petri kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 48 jam. Media Nutrient Agar (NA) yang digunakan dalam penelitian ini karena didalam media tersebut terdapat nutrisi yang merupakan substansi organik dan anorganik yang digunakan sebagai sumber energi untuk mendukung pertumbuhan bakteri. Setelah sampel diinkubasi selama 48 jam, pertumbuhan bakteri endofit terlihat di sekitar batang dan daun ketapang.



Gambar 1. Hasil Isolasi Batang dan Daun Ketapang



Gambar 2. Morfologi Koloni Bakteri

Ditemukan 6 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari batang dan daun ketapang, diantaranya yaitu 4 isolat pada batang (BK I, BK II, BK III, BK IV) dan 2 isolat pada daun (DK I dan DK II). Hasil dari pengamatan makroskopik meliputi bentuk permukaan, tepi, dan warna adalah sebagai berikut:

- BK 1: berbentuk *circular* (bulat), permukaan timbul halus, tepinya *irregular* (tidak rata), dan berwarna putih.
- BK II: berbentuk *circular* (bulat), permukaan timbul halus, tepinya *irregular* (tidak rata), dan berwarna putih.
- BK III: berbentuk *circular* (bulat), permukaan timbul halus, tepinya *irregular* (tidak rata), dan berwarna putih
- BK IV: berbentuk *circular* (bulat), permukaan timbul berombak, tepinya *irregular* (tidak rata), dan berwarna putih
- DK I: berbentuk *circular* (bulat), permukaan timbul berombak, tepinya *irregular* (tidak rata), dan berwarna putih
- DK II: berbentuk *circular* (bulat), permukaan timbul berombak, tepinya *entire* (rata), dan berwarna putih

Setelah didapatkan pertumbuhan bakteri endofit disekitar sampel, lalu dilanjutkan dengan pemurnian bakteri endofit ke dalam cawan petri menggunakan media Nutrien Agar. Perlakuan ini dimaksudkan untuk mendapatkan biakan murni dari bakteri endofit, tahapan ini dilakukan mrnggunakan metode kuadran. Lalu pada sampel diberikan kode yaitu BK untuk batang ketapang dan DK untuk daun ketapang.

Pemurnian dilakukan dengan 3 kali pengulangan lalu dilanjutkan identifikasi morfologi isolat bakteri endofit batang dan daun diidentifikasi secara makroskopik. Isolat bakteri selanjutnya diidentifikasi secara mikroskopis yaitu dilakukannya pewarnaan gram dan hasil isolat BK dan DK menunjukkan koloni bakteri gram positif berwarna ungu dan berbentuk basil.

Bakteri gram positif ketika diamata dibawah mikroskop akan berwarna ungu karena dinding sel bakteri gram positif tersusun dari peptidoglikan yang lebih tebal dari bakteri gram negatif sehingga peptidoglikan yang lebih tebal tersebut dapat mempertahankan zat warna kristal violet walaupun diberikan larutan alkohol sebagai larutan pemucat. Hal ini juga

dikarenakan terbentuknya protein ribonukleat kompleks yang dapat mempertahankan warna ungu (Kuss et al., 2013). Menurut Sukini (2017) pada bukannya, bakteri gram positif komposisi dinding selnya terdiri dari beberapa lapisan peptidoglikan yang bergabung bersama dan membentuk struktur tebal dan kaku serta pada bakteri gram positif terdapat sekitar 40 lapisan peptidoglikan atau disebut juga lapisan Murein/Mukopeptida yang merupakan 50% dari bahan dinding sel. Sedangkan pada bakteri Gram negatif hanya ada 1 atau 2 lapisan yang merupakan 5-10% dari bahan dinding sel.

Setelah dilakukan uji morfologi secara mikroskopik dengan cara pewarnaan gram, selanjutnya dilakukan uji biokimia. Uji biokimia merupakan suatu cara yang dilakukan untuk mengidentifikasi suatu biakan murni dari bakteri hasil isolasi melalui sifat fisiologinya. Pada setiap uji koloni ditanam pada media biokimia dan diamati perubahan media tersebut setelah masa inkubasi 24 jam pada suhu 37°C.

Tabel 1. Pengujian Biokimia Bakteri.

Karakteristik Pengujian	Jenis isolat			Karakteristik pengujian	Jenis isolat		
	BK II = BK I, BK III	BK IV = DK I	DK II		BK II = BK I, BK II	BK IV = DK I	DK II
Spora	+	+	+	Sukrosa	-	+	-
Koloni berwarna putih	+	+	+	Mannitol	-	-	-
Indol	-	-	-	Methyl Red (MR)	-	-	-
TSIA	Merah/Kuning	Merah/Kuning	Merah/Kuning	Voges Prokauer (VP)	-	+	+
H ₂ S	-	-	-	Sitrat	-	-	-
Motilitas	+	+	+	OF	-	-	-
Urease	-	-	-	Nitrat	+	+	+
Laktosa	-	-	-				

Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) pada medianya mengandung tiga maca gula yaitu glukosa, laktosa, dan sukrosa. Uji TSIA bertujuan agar dapat mengetahui kemampuan dari suatu bakteri dalam memfermentasikan gula untuk menghasilkan gas atau asam. Apabila terbentuknya warna kuning pada media agar itu menunjukkan reaksi asam, sedangkan apabila dapat mempertahankan warna merah dari media maka itu menunjukkan adanya reaksi basa (Cicilia et al, 2019). Media pada uji TSIA juga terdapat tambahan ferro sulfat dan sodium tiosulfat untuk mendeteksi produksi gas H₂S. Hasil yang didapatkan pada kode sampel BK II dan BK IV yaitu pada bagian atas berwarna merah dan bagian bawah berwarna kuning yang menunjukkan bahwa adanya fermentasi glukosa. Sementara pada sampel DK II bagian atas maupun bawah berwarna kuning maka ini menunjukkan adanya fermentasi laktosa dan sukrosa. Dan untuk hasil pengamatan untuk uji H₂S pada semua sampel yaitu negatif karena tidak adanya endapan berwarna hitam serta tidak menghasilkan gas.

Uji motilitas digunakan untuk melihat pergerakan bakteri dalam media tumbuh. Motilitas bakteri dapat dilihat dengan adanya pertumbuhan pada permukaan medium dan apabila tidak adanya bekas pada tusukan atau menyebar yaitu positif. Sementara apabila

terdapatnya bakteri yang tumbuh pada permukaan medium yang ditusukan berarti negatif (Panjaitan et al., 2020). Hasil seluruh pengamatan yang didapatkan pada uji motilitas batang (BK) dan daun (DK) yaitu positif karena tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri.

Uji indol digunakan untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri menghasilkan indol dengan menggunakan enzim tryptophanase. Produksi indol di dalam media dimungkinkan karena adanya tryptophan. Tryptophan adalah asam amino esensial, yang teroksidasi oleh beberapa bakteri yang mengakibatkan pembentukan indol, asam piruvat, dan ammonia. Hasil seluruh pengamatan uji Indol pada bakteri endofit batang (BK) dan daun (DK) yaitu negatif karena tidak menunjukkan adanya cincin merah pada bagian atas.

Uji Urease bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri mengubah urea menjadi amoniak. Media untuk uji urease menggunakan Urea Base Agar. Hasil seluruh pengamatan yang didapatkan bakteri endofit dari batang (BK) dan daun (DK) negatif karena tidak adanya perubahan warna media dari warna kuning menjadi merah muda.

Uji laktosa, glukosa, sukrosa dan mannitol berfungsi untuk mengetahui apakah bakteri endofit batang dan daun dapat mendekarboksilase uji gula tersebut. Hasil uji yang dikatakan positif akan berwarna kuning, sedangkan hasil uji yang negatif tidak menunjukkan perubahan warna. Perubahan warna tersebut disebabkan oleh hasil fermentasi yang dapat merubah pH media gula-gula sehingga dapat merubah warna dari media gula-gula yang digunakan (Christanti & Azhar, 2019). Hasil pengamatan yang didapatkan bakteri endofit batang ketapang II (BK II) dan daun ketapang II (DK II) menunjukkan hasil negatif pada laktosa, glukosa, sukrosa, dan manitol. Sementara hasil pengamatan yang didapatkan bakteri endofit batang ketapang IV (BK IV) menunjukkan hasil positif pada uji sukrosa karena terjadi perubahan warna hijau menjadi kuning.

Uji *Methyl Red* (MR), bertujuan untuk mendeteksi kemampuan organisme dalam memproduksi dan mempertahankan produk akhir asam stabil dari fermentasi glukosa. Methyl Red adalah indikator pH, yang tetap berwarna merah pada pH 4,4. Hasil seluruh pengamatan pada uji *Methyl Red* bakteri endofit batang (BK) dan daun (DK) yaitu negatif ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna media setelah penambahan methyl red 1%.

Uji *Voges Proskauer* (VP) menggunakan media Glukosa phospat. Uji ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam membentuk asetil metil karbinol (asetoin) dari hasil fermentasi glukosa. Setelah diinkubasi, pada media ditambahkan naphthol 5% dan KOH 40%. Hasil pengamatan pada uji VP yaitu positif pada bakteri endofit sampel BK IV (batang) setelah ditambahkan naphthol 5% dan KOH 40% terjadi perubahan warna media menjadi merah, berarti bakteri dapat membentuk asetoin dan negatif pada bakteri endofit sampel BK II (batang) dan DK II (daun) karena tidak terjadi perubahan warna pada media.

Kemudian untuk mendeteksi kemampuan suatu organisme untuk memanfaatkan sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi dilakukan uji sitrat. Jika bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya maka akan menaikkan pH dan mengubah warna medium biakan dari hijau menjadi biru. Hasil seluruh pengamatan pada uji sitrat yaitu negatif pada bakteri endofit batang (BK) dan daun (DK) karena tidak adanya perubahan warna media dari hijau menjadi biru.

Uji Oksidasi-Fermentasi (OF) dilakukan dengan membandingkan medium OF dengan atau tanpa paraffin yang diinokulasikan bakteri endofit terhadap media kontrolnya yang berwarna hijau. Inokulasi dilakukan dengan cara tusukan hingga dasar media OF. Setelah diinokulasi pada bakteri endofit, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Pada pengujian ini,

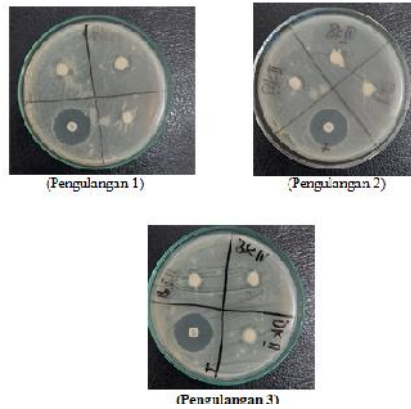
didapatkan hasil bahwa bakteri endofit BK dan DK pada media yang ditutup paraffin tidak menghasilkan perubahan media dari hijau menjadi kuning, karena bakteri endofit BK dan DK tidak terjadinya oksidasi dan fermentasi.

Selanjutnya untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri endofit dengan menggunakan energi lain digunakan uji nitrat. Uji reduksi nitrat mempunyai fungsi untuk mengetahui suatu kemampuan dari bakteri dalam mereduksi nitrat. Kemampuan yang dimiliki bakteri untuk mereduksi nitrat disebabkan karena adanya enzim nitrat reduktase (NR). Hasil yang diperoleh pada bakteri endofit batang (BK) dan daun (DK) adalah positif yang ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi warna merah pada media. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri endofit yang diuji menggunakan nitrat sebagai sumber energi lain. Bakteri endofit terhadap mikroba uji yang dilakukan menggunakan *Staphylococcus aureus* yaitu bakteri gram positif, *Escherichia coli* yaitu bakteri gram negatif, dan *Candida albicans* yaitu fungi.

Staphylococcus aureus adalah flora normal bagi manusia jika dalam jumlah normal, bakteri ini juga terdapat di udara dan lingkungan. Namun apabila jumlahnya berlebih, bakteri ini dapat bersifat patogen serta menimbulkan penyakit bagi manusia. *Staphylococcus aureus* juga bakteri yang menyebabkan infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindrom syok toksik. *Escherichia coli* merupakan parasit yang terdapat pada saluran pencernaan makanan manusia dan hewan berdarah panas. Terkadang pada manusia *E.coli* dapat menyebabkan penyakit peradangan usus kecil. *Candida albicans* merupakan mikroba flora normal yang mampu beradaptasi dengan baik pada manusia, terutama pada saluran cerna, urogenital dan kulit. *Candida albicans* adalah penyebab kandidiasis. Kandidiasis adalah infeksi jamur yang disebabkan oleh infeksi oportunistik.

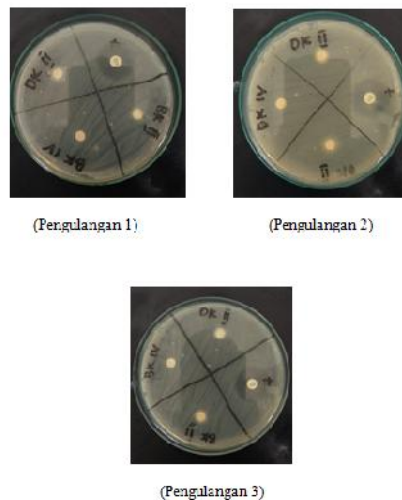
Uji aktivitas antimikroba dilakukan pada 3 isolat bakteri endofit dengan kode BK II, BK IV, dan DK II yang akan diuji menggunakan metode difusi cakram kertas dengan mikroba uji yaitu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* pada media *Nutrient agar* (NA), dan *Candida albicans* pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Pada media NA dan PDA yang masing-masing mengandung mikroba uji diletakan 3 kertas cakram yang telah ditetesi suspensi bakteri endofit sebanyak 10 µL serta disk gentamicin sebagai kontrol positif untuk *Staphylococcus aureus* & *Escherichia coli*. Sementara untuk kontrol positif pada media PDA yaitu ketoconazole yang ditetesi sebanyak 10 µL ke kertas cakram. Setelah itu media tersebut diinkubasi selama 1×24 jam sebanyak tiga kali pengulangan pada suhu 37⁰C dengan posisi cawan terbalik, ini berfungsi untuk menghindari uap air yang memenuhi tutup cawan petri hasil dari penguapan media selama inkubasi (Wardhani et al., 2020)

Setelah 24 jam, dilakukan pengukuran zona bening yang terbentuk disekitar cakram kertas menggunakan jangkan sorong yang menunjukkan potensi daya hambat bakteri endofit terhadap mikroba uji yaitu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans*. Pada penelitian Wina yang dilakukan pada tahun 2020 menunjukkan bahwa ekstrak etanol dari daun ketapang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 50%, 75%, dan 100% dengan nilai diameter zona hambat berturut-turut yaitu 22,3 mm; 20,5 mm; 20,5 mm. Dan pada penelitian Annisa di tahun 2020 juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol dari daun ketapang efektif menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Adanya penghambatan bakteri karena tanaman ketapang mengandung golongan senyawa kimia yaitu flavonoid, alkaloid, saponin yaitu senyawa sekunder yang memiliki aktivitas antibakteri.

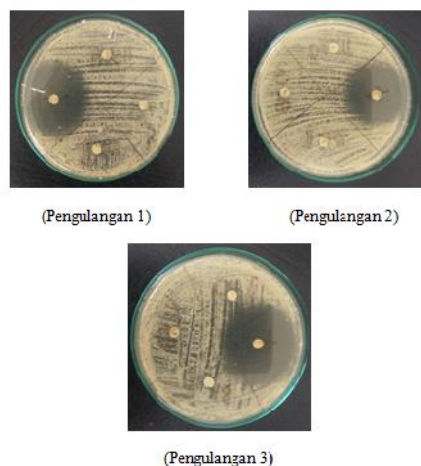


Gambar 2. Aktivitas Antimikroba Bakteri Endofit Mangrove Ketapang Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Dari hasil pengukuran rata-rata diameter zona hambatnya terhadap *Staphylococcus aureus*, daya hambat antimikroba dengan kode BK II (6,21 mm) termasuk kategori lemah, kode BK IV (8,53 mm) termasuk kategori lemah, kode DK (0,00 mm) merupakan kategori tidak dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* karena tidak memiliki zona bening disekitar kertas cakram.



Gambar 3. Aktivitas Antimikroba Bakteri Endofit Batang dan Daun Ketapang Terhadap Bakteri *Escherichia coli*.



Gambar 4. Aktivitas Antimikroba Bakteri Endofit Batang dan Daun Ketapang Terhadap Jamur *Candida albicans*.

Dari hasil pengukuran rata-rata diameter zona hambatnya terhadap *Escherichia coli* dan *Candida albicans*, daya hambat antimikroba dengan kode BK II, BK IV, dan DK II (0,00 mm) adalah termasuk kategori tidak dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Candida albicans* karena tidak ada terdapat zona bening disekitar cakram kertas. karena menurut *Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI)*, respon hambatan lemah ketika diameter zona hambat antibakteri 14 mm, respon hambatan sedang ketika diameter zona hambat antibakteri 15-19 mm, respon hambatan rentan ketika diameter zona hambat antibakteri 20 mm, dan respon hambatan tidak rentan ketika diameter zona hambat antibaktei <20 mm.

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan:

1. Terdapat 6 isolat bakteri endofit dari batang yang diberi kode BK I, BK II, BK III, BK IV dan kode DK I, DK II untuk isolat bakteri endofit dari daun. Hasil identifikasi morfologi secara mikroskopik dengan pewarnaan gram BK I, BK II, BK III,, BK IV, DK I, dan DK II merupakan jenis basil gram positif dan teridentifikasi sebagai *Bacillus sp.*
2. Pengujian uji aktivitas antimikroba dari bakteri endofit mangrove ketapang menunjukkan bahwa isolat bakteri endofit BK II dengan diameter rata-rata 6,21 mm, BK IV 8,53 mm merupakan kategori lemah dalam menghambat mikroba uji *Staphylococcus aureus*. Sementara pada DK II menunjukkan bahwa tidak ada kemampuan untk menghambat mikroba uji *Staphylococcus aureus*. Pada mikroba uji *Escherichia coli* dan *Candida albicans* pada isolat BK II,BK IV, dan DK II Tidak memiliki kemampuan untuk menghambat mikroba uji uji *Escherichia coli* dan *Candida albicans*.

SARAN

Disarankan untuk peneliti lain melakukan identifikasi dan purifikasi terhadap senyawa bioaktif yang dihasilkan bakteri endofit akar mangrove ketapang, serta pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan bakteri uji yang berbeda.

DAFTARPUSTAKA

- Aryani, P., Kusdiyantini, E., & Supriyadi, A. (2020). Isolasi Bakteri Endofit Daun Alang-Alang (*Imperata cylindrica*) dan Metabolit Sekundernya yang Berpotensi sebagai Antibakteri. *Jurnal Akademika Biologi*, 9(2), 20–28.
- Biokimia, I. S. (2019). *Berasosiasi Dengan Alga Turbinaria ornata (Turner) J. Agardh SERTA*. 8, 351–359.
- Christanti, S. D., & Azhar, M. H. (2019). Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.* Pada Produk Beku Perikanan di Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya II, Jawa Timur Identification Bacteri *Escherichia coli and Salmonella sp. on Frozen*. 4(2), 62–72.
- Darma, W., & Marpaung, M. P. (2020). Analisis Jenis Dan Kadar Saponin Ekstrak Akar Kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers) SECARA GRAVIMETRI. *Dalton: Jurnal Pendidikan Kimia Dan Ilmu Kimia*, 3(1), 51–59. <https://doi.org/10.31602/dl.v3i1.3109>
- Febriani, H., Mashitah, U., Pima, E., & Tambunan, S. (2021). Penapisan Bakteri Penghasil Antimikroba dari Pasir Pantai Sialang Buah Kecamatan Teluk Mengkudu Kabupaten Serdang Bedagai. *Journal of Marine Research*, 10(4), 560–564.
- Hermawan, H., Sari, B. L., & Nashrianto, H. (2018). Kadar Polifenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etil Asetat dan Metanol Buah Ketapang (*Terminalia catappa* L.). *Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Bidang Farmasi*, 1(1), 1–8. <http://jom.unpak.ac.id/index.php/Farmasi/article/view/713>
- Liempepas, A., Lolo, W. A., & Yamlean, P. V. Y. (2019). Isolasi Dan Uji Antibakteri Dari Isolat Bakteri Yang Berasosiasi Dengan Spons *Callyspongia Aerizusa* Serta Identifikasi Secara Biokimia. *Pharmakon*, 8(2), 380. <https://doi.org/10.35799/pha.8.2019.29304>
- Leonardo, A Seme, Elisabet Tangkonda, Nemey A Ndaong, 2019. Uji altovitas ekstrak etanol daun Ketapang terhadap Pertumbuhan E.Coli dan S.Aureus. *Jurnal Veteran Nusantara*. VOL 3 NO 2
- Lele, O. K., & Indriyani, W. (2020). Karakterisasi mikroskopis dan uji biokimia bakteri pelarut fosfat (bpf) dari rhizosfer tanaman jagung fase vegetatif. *Jurnal Kajian Masalah Pertanian*, 1(1), 9–17.
- Ramadhanty, M. A., Lunggani, A. T., & Nurhayati. (2021). Isolasi bakteri endofit asal tumbuhan mangrove *Avicennia marina* dan kemampuannya sebagai antimikroba patogen *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* secara in vitro. *NICHE Journal of Tropical Biology*, 4(1), 16–22.

- Rezekikasari, & Harianto, R. (2019). Modifikasi Alternatif dari Sayuran untuk Analisis Kuantitatif Pertumbuhan Mikroorganisme Asal Tanah Gambut Kalimantan Barat dengan Metode TPC. *Perkebunan Dan Lahan Tropika*, 9(1), 13–18.
- Sumitro, Y., Syuryati, Hamdan, S., & Putri, E. E. (2022). Perbanyak Massal Trichoderma Sp. Pada Media Potato Dextrose Agar (Pda), Beras Dan Jagung. *Inovasi Teknologi Pertanian*, 7(1), 1–7. <http://repository.pertanian.go.id/handle/123456789/14689>
- Wardhani, A. K., Uktolseja, J. L. ., & Djohan. (2020). Identifikasi Morfologi Dan Pertumbuhan Bakteri Padapada Cairan Terfermentasi Silase Pakan Ikan. *Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Saintek (SNPBS) Ke-V*, 5(1), 411–419.