

Antimicrobial Activity of Balakacida (*Chromolaena odorata*) Endophytic Bacteria Isolated from Aceh Besar Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

Wahyu Eka Sari^{1,3,4*}, Darmawi¹, Morizka Wianda², Erina¹, Rumi Sahara Zamzami¹, Muhammad Hambal^{1,3}, M. Nur Salim¹, Hennivanda^{1,3}, Triva Murtina Lubis¹

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala

³Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

⁴Center for Tropical Veterinary Studies-One Health Collaboration Center, Universitas Syiah Kuala

*Alamat Korespondensi: sariwahyueka@gmail.com

ABSTRACT

This study aims to isolate the balakacida (*Chromolaena odorata*) endophytic bacteria from Aceh Besar and to test its antimicrobial activity against pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Balakacida leaf samples were isolated and purified using nutrient agar (NA) media, followed by morphological observations and antimicrobial in vitro tests using a disk diffusion assay (Kirby Bauer). The results showed that a total of 50 endophytic bacterial colonies were isolated from the balakacida and 12 selected endophytic bacterial isolates had different morphologies from cream to yellowish cream color, then after antagonist test directly screening obtained four endophytic bacterial isolates which had the potential as antimicrobial. The results of in vitro antimicrobial tests showed that the four isolates of balakacida endophytic bacteria (BEA-1, BEA-2, BEA-3, and BEA-4) were able to inhibit the growth of pathogenic bacteria *S. aureus* and *P. aeruginosa* with the diameter of the zone of inhibition was 16.03 mm - 19.75 mm (medium inhibition category) and 15.35 mm - 21.24 mm (weak to strong inhibition category), respectively. Based on these results, it can be concluded that BEA-2 isolate has the strongest inhibition of 21.24 mm, so that it has the potential as an antimicrobial candidate for *P. aeruginosa* and can be used as an alternative antimicrobial product.

Keywords: endophytic bacteria, balakacida, antimicrobial, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

PENDAHULUAN

Bakteri endofit merupakan organisme yang berukuran mikroskopis yang hidup di dalam jaringan tanaman (xilem atau floem), daun, akar, buah, dan batang (Strobel dan Daisy, 2003). Bakteri ini hidup bersimbiosis mutualisme yaitu saling menguntungkan satu sama lain dengan tanaman inangnya, serta memanfaatkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman untuk keberlangsungan hidupnya. Sebaliknya, bakteri endofit juga memberikan keuntungan terhadap tanaman yang ditumpanginya seperti memproteksi tanaman melawan herbivora, serangga, atau jaringan yang patogen serta mampu menghasilkan hormon pertumbuhan untuk menstimulasi

pertumbuhan tanaman (Sagita *et al.*, 2017). Kemampuan bakteri endofit menghasilkan senyawa aktif yang menyerupai tanaman inangnya tersebut merupakan potensi yang dapat dikembangkan tanpa perlu mengekstrak tanaman, sehingga dapat menjaga kearifan lokal.

Bakteri endofit dapat masuk ke dalam jaringan tanaman umumnya melalui akar, namun bagian tanaman yang terpapar udara langsung seperti bunga, batang, daun (melalui stomata) dan kotiledon, juga dapat menjadi jalur masuk bakteri endofit (Purwanto *et al.*, 2014). Bakteri ini juga memiliki sifat yang unik yaitu dengan fisiologi tanaman yang berasal dari spesies yang sama namun tumbuh pada lingkungan yang berbeda, maka bakteri endofit yang

dihasilkan berbeda sesuai dengan kondisi tempat tumbuh dan lingkungannya (Hung dan Annapurna, 2004). Tanaman dengan jenis ataupun spesies yang sama memiliki bakteri endofit yang tidak selalu sama, tergantung kondisi pertumbuhan khususnya tanah (Bhore dan Sathisya, 2010).

Indonesia merupakan salah satu negara dengan kekayaan hayati terbesar di dunia yang memiliki lebih dari 30.000 spesies tanaman tingkat tinggi (Saxena *et al.*, 2011; Chavan *et al.*, 2013). Tanaman balakacida (*Chromolaena odorata* (L) R.M King & H. Rob) merupakan salah satu jenis tanaman dari family *Asteraceae* / *Compositae*. Daunnya mengandung beberapa senyawa utama seperti tannin, fenol, flavonoid, saponin dan steroid. Selain itu balakacida memiliki senyawa dengan aktivitas antibakteri (Lavanya dan Brahmaprakash, 2011) serta aktivitas sebagai anti-inflamasi (Owoyele *et al.*, 2005). Menurut penelitian Syahruramadhan *et al.*, (2016), ekstrak daun balakacida (*C. odorata*) memiliki aktivitas antifungi terhadap pertumbuhan *A. flavus*. Penelitian Yutika *et al.*, (2015), menjelaskan bahwa aktivitas bakteri endofit dari tanaman balakacida memiliki ekstrak etanol yang dapat menyembuhkan luka gangren.

Menurut Fitrah *et al.*, (2017), ekstrak kasar daun balakacida memiliki efek antioksidan. Efek yang dihasilkan ini disebabkan oleh kandungannya yang tinggi akan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan, yang mampu menghambat proses oksidasi. Dalam penelitian Siripan *et al.*, (2018), terdapat 23 genus bakteri endofit yang diisolasi dari tanaman *C. odorata* yang tumbuh di bawah tanah yang terkontaminasi Cd (Cadmium) di pertambangan Thailand. Udaya *et al.*, (2018), melaporkan bahwa ekstrak yang diperoleh melalui proses ekstraksi langsung *C. odorata* sebagian besar memiliki kandungan fitokimia dan menunjukkan hasil *total phenol content*

(TPC), *total flavonoid content* (TFC) dan *total antioxidant content* (TAC) yang tinggi jika dibandingkan dengan ekstraksi sekuensial.

Sejauh ini penelitian isolasi bakteri endofit balakacida sudah pernah dilaporkan di daerah lain, namun hanya sebatas isolasi hingga analisis fitokimia dari tanaman balakacida. Penelitian mengenai isolasi bakteri endofit balakacida asal Aceh Besar dan uji antimikrobanya belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengisolasi bakteri endofit pada daun balakacida (*C. odorata*) dan menguji aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

MATERIAL DAN METODE

Isolasi Bakteri Endofit Balakacida

Bagian tanaman yang digunakan adalah bagian pucuk daunnya. Sampel tanaman yang digunakan dalam keadaan segar terlebih dahulu dipotong sepanjang 1 cm. Potongan sampel tersebut disterilkan secara bertahap yaitu dengan direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit, kemudian direndam dalam larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 1% selama 5 menit, dan terakhir direndam kembali dalam alkohol 70% selama 1 menit. Selanjutnya dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Aquades steril hasil rendaman terakhir disebar ke dalam media *nutrient agar* (NA) sebanyak 0,1 ml, sebagai kontrol negatif dengan tiga pengulangan, hal tersebut dilakukan untuk membuktikan bahwa hasil koloni yang tumbuh hanya dari dalam jaringan tanaman.

Potongan sampel yang sudah disterilisasi kemudian digerus menggunakan mortar secara aseptik, kemudian dilarutkan dalam 12,5 mM buffer fosfat (pH 7.1). Ekstrak yang diperoleh dari hasil gerusan disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm

selama 10 menit pada suhu ruang. Supernatan dari hasil sentrifugasi diambil sebanyak 0,1 ml, kemudian disebar secara merata pada media NA. Selanjutnya media yang berisi supernatan tersebut diinkubasi selama 2-15 hari pada suhu 28°C. Isolasi bakteri endofit ini dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan.

Uji *in vitro* Antimikroba *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*

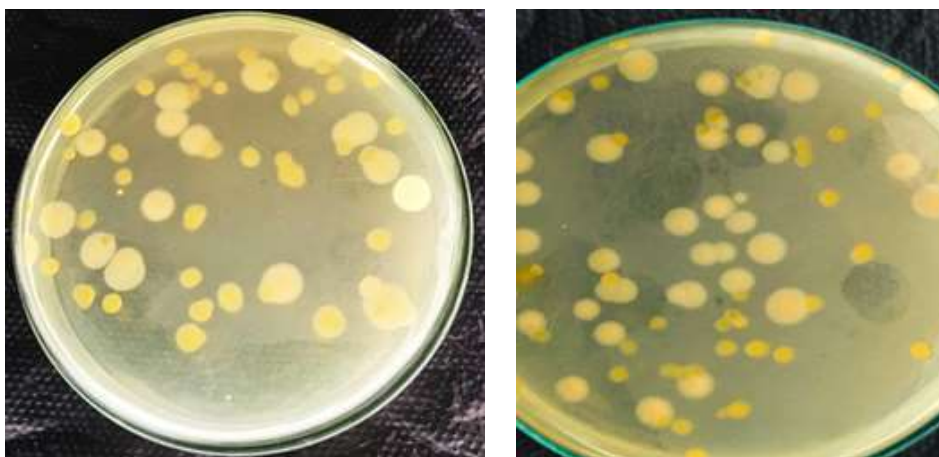
Uji *in vitro* antimikroba dilakukan dengan metode *disk diffusion assay*. Inokulasi bakteri pada agar MHA optimal dilakukan sekitar 15 menit setelah inokulum bakteri siap. Tahap awal yang dilakukan yakni kapasulas steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Permukaan pada media agar MHA diinokulasikan bakteri patogen dengan mengulaskan kapas berisi suspensi bakteri di seluruh permukaan media. Prosedur ini diulangi sebanyak dua kali dengan

pemutaran MHA setidaknya 60° supaya distribusi merata pada seluruh permukaan agar. Setiap cakram yang berisi larutan uji ditetaskan larutan uji masing-masing sebanyak 20 µL. Setelah keseluruhan proses selesai, cawan-cawan Petri tersebut dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Hasil inkubasi berupa daerah bening di sekitar cakram menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri diinterpretasikan sebagai zona hambat (Brooks *et al.*, 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Makroskopik dan Mikroskopik Bakteri Endofit Balakacida Asal Aceh Besar

Sebanyak 50 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari tanaman balakacida dengan morfologi yang berbeda-beda. Berikut adalah gambar hasil isolasi bakteri endofit yang berasal dari dalam jaringan tumbuhan balakacida (Gambar 1).



Gambar 1. Morfologi koloni bakteri endofit balakacida asal Aceh Besar yang tumbuh di media NA selama 10 hari

Berdasarkan gambar di atas dapat dilihat bahwa koloni bakteri endofit yang tumbuh di media NA sebagian besar memiliki morfologi berbentuk bulat, permukaan licin, tepian rata, dan berwarna krem hingga kekuning-kuningan. Hal ini selaras dengan penelitian Afizar dan Parlina (2017) yang menyatakan bahwa warna koloni isolat bakteri endofit dominan berwarna krem dan selebihnya dengan warna krem gelap, kecokelatan, dan kekuning-kuningan. Bentuk koloni isolat bakteri endofit lebih dominan berbentuk

bulat, sedangkan bentuk elevasi koloni sebagian besar didominasi oleh bentuk cembung dan rata. Salah satu faktor yang mempengaruhi sedikit atau banyaknya bakteri endofit adalah jenis dan umur daun tanaman balakacida.

Berdasarkan hasil purifikasi bakteri endofit, sebanyak delapan isolat bakteri endofit balakacida terpilih dapat tumbuh dengan baik di media NA, setelah 10 hari. Berikut karakteristik morfologi dari bakteri endofit daun balakacida yang disajikan dalam Tabel 1 di bawah ini:

Tabel 1. Karakteristik morfologi isolat bakteri endofit balakacida pada media NA, umur 10 hari

Kode Isolat	Karakteristik Morfologi		
	Tipe	Bentuk	Warna
BEA-1	Berlekuk	Tidak beraturan,	Krem kecokelatan
BEA-2	Licin	Bundar	Krem
BEA-3	Licin	Tidak beraturan	Krem Putihan
BEA-4	Licin	Tidak beraturan	Krem
BEA-5	Seperti karang	Tidak beraturan	Krem
BEA-6	Tidak beraturan	Tidak beraturan	Krem
BEA-7	Berlekuk	Bergerigi	Krem kekuningan
BEA-8	Berombak	Tidak beraturan	Krem kekuningan

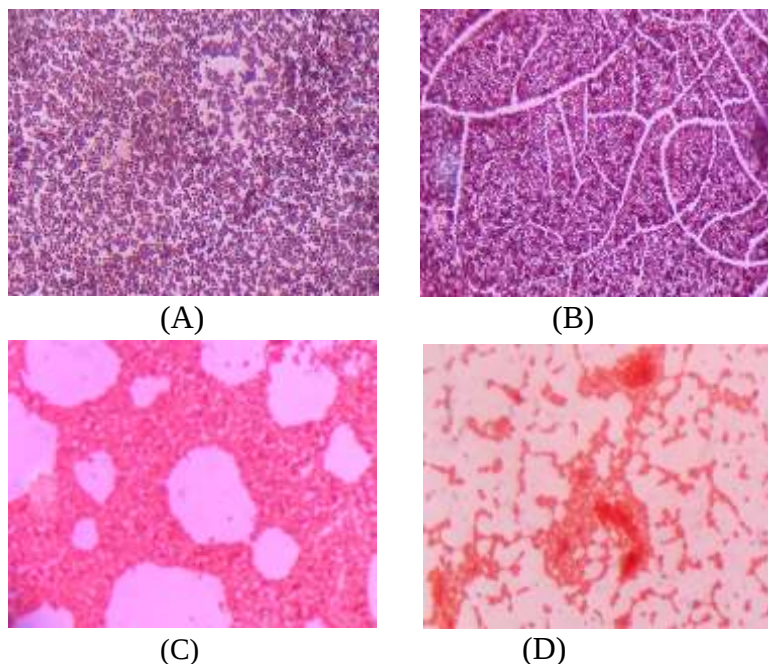
Berdasarkan pengamatan secara makroskopis, semua isolat tersebut memiliki morfologi yang tidak seragam, berwarna krem kecokelatan dan kekuning-kuningan. Permukaan rata dan tidak rata, berdiameter ≥ 2 mm. Morfologi koloni bakteri pada media agar tergantung pada sejumlah faktor seperti media kultur, temperatur, dan waktu inkubasi, usia kultur,

dan jumlah sub kultur yang telah dilakukan (Oktavia dan Pujiyanto, 2018). Parija (2012) mengatakan bahwa karakterisasi morfologi bakteri secara makroskopis dapat dilakukan dengan mengamati bentuk, elevasi, tepian, dan warna koloni.

Pewarnaan Gram merupakan tahapan penting dalam langkah awal identifikasi dengan melihat karakteristik morfologi dari

isolat bakteri. Pewarnaan Gram berfungsi untuk membedakan antara bakteri Gram positif dengan bakteri Gram negatif. Pada bakteri Gram positif mampu mempertahankan warna kristal violet

dengan menunjukkan warna ungu karena dinding bakteri tersebut mengandung peptidoglikan. Berikut adalah hasil dari pewarnaan Gram pada Gambar 2.



Gambar 2. Karakteristik mikroskopis bakteri endofit balakacida dengan perbesaran 400x. (A) dan (B) bakteri Gram positif dari isolat yang berbeda. (C) dan (D) bakteri Gram negatif dari isolat yang berbeda.

Berdasarkan pengamatan mikroskopis, hasil pengamatan dari ke-8 isolat terpilih di atas, terdapat enam isolat (BEA-1, BEA-2, BEA-5, BEA-6, BEA-7, BEA-8) tergolong ke dalam bakteri Gram negatif berbentuk coccus dan dua isolat (BEA-3 dan BEA-4) tergolong ke dalam bakteri Gram positif berbentuk coccus. Sel bakteri memiliki bentuk yang berbeda-beda, tetapi secara umum sel bakteri yang banyak dijumpai, yaitu bentuk bulat (coccus), bentuk batang (basil) dan bentuk spiral (Afizar dan Parlina, 2017).

Aktivitas Antimikroba Bakteri Endofit Balakacida Asal Aceh Besar terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*

Uji aktivitas antimikroba bertujuan untuk mengetahui aktivitas senyawa

metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri endofit balakacida sebagai antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen. Dalam studi eksperimen ini digunakan bakteri uji *Staphylococcus aureus* karena bakteri ini merupakan bakteri piogenik yang dapat memproduksi nanah pada luka dan merupakan bakteri Gram positif, sedangkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan patogen oportunistik yang dapat menyebabkan penyakit infeksi pada hewan dan tergolong ke dalam bakteri Gram negatif. Aktivitas antimikroba bakteri endofit balakacida asal Aceh Besar terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* ditunjukkan pada Tabel 2 di bawah ini:

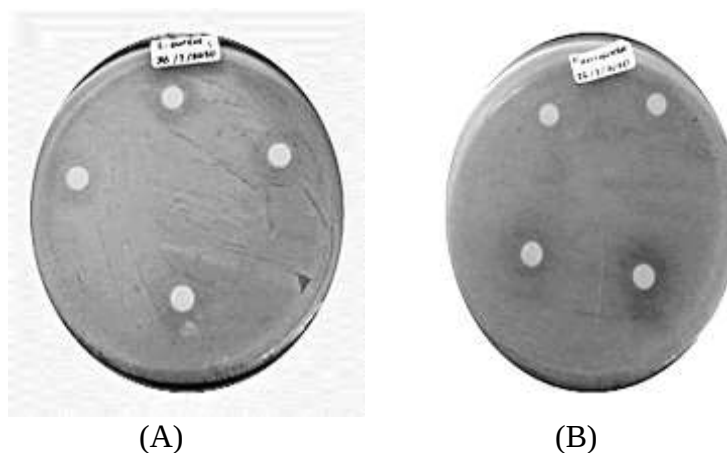
Tabel 2. Hasil uji antimikroba bakteri endofit balakacida terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* berdasarkan metode disk diffusion assay (Kirby-Bauer)

Bakteri uji	Bakteri endofit	Rata – rata diameter zona hambat (mm)	Kriteria kekuatan
<i>Staphylococcus aureus</i>	BEA-1	19,75	Sedang
	BEA-2	16,03	Sedang
	BEA-3	19,11	Sedang
	BEA-4	17,23	Sedang
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BEA-1	18,52	Sedang
	BEA-2	21,24	Kuat
	BEA-3	15,35	Sedang
	BEA-4	20,00	Sedang

Hasil uji *disk diffusion assay* menurut metode *Kirby-Bauer* dapat dilihat bahwa zona hambat berdiameter besar terdapat pada bakteri *P. aeruginosa* BEA-2 yaitu 21,24 mm tergolong ke dalam hambatan kuat, sedangkan zona hambat terkecil sebesar 15,35 mm tergolong ke dalam hambatan sedang. Pada bakteri *S. aureus* zona hambat paling tinggi yaitu isolat BEA-1 sebesar 19,75 mm tergolong ke dalam hambatan sedang dan yang paling rendah sebesar 16,03 mm yang tergolong ke dalam hambatan sedang. Interpretasi zona hambat

di atas menurut Greenwood (1995) menyatakan diameter zona bening > 20 mm memiliki daya hambat kuat, diameter zona bening 15–20 mm mempunyai daya hambat sedang dan diameter zona bening 10-15 mm dikategorikan daya hambat lemah, serta jika < 10 mm dikategorikan tidak mempunyai daya hambat.

Hasil uji *disk diffusion assay* pada bakteri antagonis *S. aureus* dan *P. aeruginosa* dapat dilihat pada Gambar 5 di bawah ini:



Gambar 3. Hasil positif uji disk diffusion assay bakteri endofit balakacida terhadap bakteri patogen (A) *Staphylococcus aureus* dan (B) *Pseudomonas aeruginosa*

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri ini menurut Surjowardojo et al. (2015) diantaranya stabilitas zat aktif dari tanaman tersebut, besarnya inokulum, masa pengeraman dan aktivitas metabolik bakteri. Selain itu jenis bahan antimikroba juga menentukan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Menurut Purwanto et al. (2014), menyatakan bahwa bakteri endofit membunuh bakteri patogen dengan cara mengganggu metabolisme bakteri, kemudian menghambat sintesis dinding sel bakteri dan sintesis protein serta merusak sintesis asam nukleat dari bakteri patogen.

KESIMPULAN

Bakteri endofit berhasil diisolasi dari bagian daun tanaman balakacida dan memiliki morfologi koloni yang berbeda-beda. Sebanyak empat isolat bakteri endofit asal balakacida diketahui memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* dengan kategori penghambatan sedang hingga kuat. Isolat BEA-2 memiliki penghambatan paling kuat terhadap *P. aeruginosa* diantara ketiga isolat lainnya, sehingga isolat ini berpotensi sebagai kandidat alternatif antibiotik.

DAFTAR PUSTAKA

- Afizar dan I. Parlina. 2017. Bakteri endofit asal akar kopi dan potensinya sebagai agen pengendali penyakit akar putih *Rigidoporus microporus*. **J. Bioleuser**. 1(2): 54 – 62.
- Bhore, S. J. dan G. Sathisha. 2010. Screening of endophytic colonizing bacteria for cytokininlike compounds: crude cell-free broth of endophytic colonizing bacteria is unsuitable in cucumber cotyledon bioassay. **World J. Agr. Sci**. 6(4): 345-52.
- Brooks, G.F., K. Carroll, dan J.S. Butel. 2013. **Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. Ed ke-26**. McGraw-Hill Company Inc, Philadelphia.
- Chavan, R.B. dan D.K. Gaikwad. 2013. Antibacterial activity of medicinally important two species of *Allophylus- Allophylus cobbe* (L.) Raeusch. and *Allophylus serratus* (Roxb.) Kurz. **J. Pharm. Phytochem**. 2(1): 1-7.
- Fitrah, M., H. Winarno, dan P. Simanjuntak. 2017. Isolasi dan identifikasi senyawa kimia zat anti kanker dari daun kopasanda (*Chromolaena odorata* (L.)). **Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia**. 15 (1): 77-81.
- Greenwood. 1995. **Antibiotics, Susceptibility (Sensitivity) Test Antimicrobial and Chemotherapy**. Mc. Graw Hill Company, USA.
- Hung, P.Q. dan K. Annapurna. 2004. Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* Sp.). **Omonrice**. 12: 92-101.
- Lavanya, G. dan G.P. Brahmaprakash. 2011. Phytochemical screening and antimicrobial activity of compounds from selected medicinal and aromatic plants. **Int. J. Sci. Nat**. 2 (2): 287-291.
- Oktavia, N. dan S. Pujiyanto. 2018. Isolasi dan uji antagonisme bakteri endofit tapak dara (*Catharanthus Roseus*, L.) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. **Berkala Bioteknolog**. 1(1): 6 – 12.
- Owoyele, V.B., J.O. Adediji, dan A.O. Soladoye. 2005. Anti-inflammatory activity of aqueous leaf extracts of *Chromolaena odorata*. **Inflammopharmacol**. 13 (5 – 6): 479 - 484.
- Parija, S.C. 2012. **Microbiology and Immunology Second Edition**. Reed Elsevier India Private Limited, New Delhi.
- Purwanto, U.M.S., F.H. Pasaribu, dan M. Bintang. 2014. Isolasi bakteri endofit dari tanaman sirih hijau (*Piper betle* L.) dan potensinya sebagai penghasil senyawa antibakteri. **Curr. Biochem**. 1 (1): 51 – 57.
- Sagita, D., N. Suharti, dan N. Azizah. 2017. Isolasi bakteri endofit dari daun sirih (*Piper betle* L.) sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. **J. Ipteks Terapan**. 11 (1): 65 – 74.
- Saxena, G. dan S.S. Kalra. 2011. Antimicronial activity pattern of certain terpenoids. **Int. J. Pharm Bio Sci**. 2(1): 87-91.
- Siripan, O., A. Thamchaipenet, dan W. Surat. 2018. Enhancement of the efficiency of Cd phytoextraction using bacterial endophytes isolated from *Chromolaena odorata*, a Cd hyperaccumulator. **Int. J. Phytoremed**. 20 (11): 1096–1105.
- Surjowardojo, P., T.E. Susilorini, dan G.R.B. Sirait. 2015. Daya hambat dekok kulit apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill.) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas* sp. penyebab mastitis pada sapi perah. **J. Ternak Tropika**. 16 (2): 40 – 48.
- Strobel, G. dan B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol. Mol. Biol. Rev. : MMBR**. 67 (4) : 491–502.
- Syahruramadhan, M., N.A. Yanti, dan L. Darlian. 2016. Aktivitas antijamur ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamck.) dan daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) terhadap *Candida albicans* dan *Aspergillus flavus*. **J. Ampibi** . 1 (2) : 7 – 12.

Udaya, P.N.K., V. Sriraman, V. Devika, V. Peneena, N. Sripriya, S. Bhuvaneswari, dan B. Sampathkumar. sequential extracts of *Chromolaena odorata* leaves. **Int. J. Res. Pharm. Sci.** 10 (2): 914 – 921.

Yutika, M., R. Rusli, dan A.M. Ramadhan. 2015. Aktivitas antibakteri daun kirinyuh (*Chromolaena*

2018. Comparative studies on phytochemistry, antioxidant, and antibacterial activity of direct and *odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.) terhadap bakteri gangren. **Prosiding Seminar Nasional Kefarmasian.** 1 (1): 75 – 81.