

KARAKTERISASI BAKTERI ENDOFIT TANAMAN PURWOCENG SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA STEROID DAN ANTIPATOGEN

Endophytic Bacteria From Purwoceng as Steroid and Antipatogenic Compounds Producers

DWI N. SUSILOWATI¹⁾, HENDRA GINANJAR²⁾, ERNY YUNIARTI³⁾, MAMIK SETYOWATI¹⁾, dan IKA ROOSTIKA¹⁾

¹⁾Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

²⁾Universitas Pakuan, Jalan Pakuan Bogor 16111

³⁾Balai Penelitian Tanah, Jl. Tentara Pelajar No. 12, Bogor 16143

e-mail: d_nengsusi@yahoo.com atau h.nofian@gmail.com

Diterima: 01-11-2017; Direvisi: 25-01-2018; Disetujui: 14-03-2018

ABSTRACT

Tanaman purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) merupakan tanaman obat komersial asal Indonesia yang bermanfaat sebagai afrodisiak, diuretika, dan tonik. Tanaman purwoceng diketahui dapat memproduksi beberapa senyawa metabolit sekunder fitosterol (stigmasterol, sitosterol, bergapten, ergosterol, amirin, dan vitamin E). Konsentrasi senyawa fitosterol dalam tanaman ini sangat kecil, namun memiliki banyak manfaat. Senyawa bioaktif yang berkhasiat pada suatu tanaman ternyata juga ada yang dihasilkan oleh mikroba endofit. Hal ini dapat membuka peluang untuk memproduksi senyawa sterol menggunakan kultur mikroba endofit yang terdapat pada tanaman purwoceng. Tujuan penelitian ini untuk menapis dan mengkarakterisasi bakteri endofit dari tanaman purwoceng yang bersifat antagonis terhadap sejumlah mikroba patogen (*Enteropatogenik Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas pseudomallei*, dan *Candida albicans*), dan menghasilkan senyawa sterol. Metode difusi kertas cakram digunakan untuk uji antipatogen dan analisis Kromatografi Lapis Tipis untuk analisis senyawa sterol. Senyawa sterol diperoleh dari tanaman purwoceng pada isolat Endo PWC I.GP-1. Beberapa isolat mampu mencegah pertumbuhan patogen ((*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, dan *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC)), yaitu Endo PWC LD2, Aktino PWC GP-4, Endo PWC GP-2, Endo PWC D-1, dan Endo PWC I.GP-1. Isolat Endo PWC I.GP-1 yang mampu menghasilkan senyawa sterol dan metabolit antibakteri diidentifikasi sebagai *Corynebacterium* sp.

Kata kunci: Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.), bakteri endofit, sterol, antipatogen

ABSTRACT

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) is a commercial medicinal plant from Indonesia that is useful as an aphrodisiac, diuretic, and tonic. Purwoceng are known to produce some secondary metabolite compounds of phytosterol (stigmasterol, sitosterol, bergapten, ergosterol, amirin, and vitamin E). The quantity of phytosterol compounds isolated from this plant is very small, but have many benefits. Bioactive compounds that are nutritious in a plant was also produced by endophytic microbes. It gives the opportunity to produce sterol compounds using endophytic microbial culture found in purwoceng. The objectives of this study were to screen and characterize endophytic bacteria from purwoceng that are antagonistic to a number of pathogenic microbes (*Enteropatogenik Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas pseudomallei*, and *Candida albicans*), and produce sterol compounds. The paper disc diffusion method is used for antipatogenic tests and Thin Layer Chromatography analysis for analysis of sterol compounds. Sterol

compounds obtained from endophytic bacterial isolates Endo PWC I.GP-1. Some isolates were able to prevent the growth of pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC)), Endo PWC LD2, Aktino PWC GP-4, Endo PWC GP-2, Endo PWC D-1, and Endo PWC I.GP-1. Endo PWC I.GP-1 endophytic isolate which capable of producing sterol compounds and such antibacterial metabolites is identified as *Corynebacterium* sp.

Keywords: Purwoceng, endophytic bacteria, sterols, antipatogenic

PENDAHULUAN

Tanaman purwoceng (*Pimpinella alpina* Kds atau *Pimpinella pruatjan* Molk) merupakan salah satu tanaman obat komersial di Indonesia yang berfungsi sebagai afrodisiak, diuretik, dan tonik. Tanaman ini secara endemik tumbuh di dataran tinggi Dieng Jawa Tengah, Gunung Pangrango Jawa Barat, dan area pegunungan di Jawa Timur (Endang et al. 1990). Hingga saat ini aspek-aspek agronomi, kultur *in vitro*, fitokimia dan farmakologi tanaman purwoceng telah banyak dilaporkan, namun aspek mikrobiologi terutama mikroba endofit belum banyak diteliti. Tanaman yang tumbuh di area dengan keragaman biologis tinggi memiliki prospek menjadi inang bagi mikroba endofit dengan keragaman biologis yang tinggi (Strobel 2003).

Tanaman purwoceng terbukti memproduksi beberapa senyawa metabolit sekunder fitosterol seperti stigmasterol, sitosterol, bergapten, ergosterol, amirin, dan vitamin E. Fitosterol yang terkandung dalam tanaman purwoceng jumlahnya sangat sedikit, sedangkan manfaatnya sangat banyak dalam dunia kesehatan sebagai bahan baku obat herbal, salah satunya untuk menurunkan kadar kolesterol dalam darah. Oleh karena itu, sulit untuk mencari bahan baku dalam jumlah besar secara berkesinambungan. Salah satu upaya untuk mengatasi masalah keterbatasan bahan baku tersebut adalah dengan cara pendekatan bioteknologi terutama skrining mikroba endofit sebagai penghasil metabolit sekunder dari tanaman purwoceng.

Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman pada periode tertentu dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit (Tan and Zou, 2001). Menurut Strobel (2003), hampir 300.000 spesies tanaman yang ada di bumi, masing-masing tanaman ditempati oleh satu atau lebih mikroba endofit. Sampai saat ini baru sedikit tanaman yang telah dipelajari secara lengkap berhubungan dengan aspek biologi dari endofit. Dengan demikian, peluang mendapatkan mikroba endofit sebagai sumber potensial senyawa baru dari ribuan tanaman dari berbagai ekosistem sangatlah besar.

Bakteri endofit dapat menghasilkan senyawa alami khusus yang kadang-kadang sama persis dengan senyawa yang dihasilkan oleh tanaman inangnya, diantaranya cryptocandin, antifungi yang dihasilkan oleh mikroba endofit *Cryptosporiopsis quercina* yang diisolasi dari tanaman obat *Tripterigeum wilfordii*, dan berkhasiat sebagai antifungi patogen pada manusia yaitu *Candida albicans* dan *Trichopyton* sp. Diketahui juga bahwa mikroba endofit *Pestalotiopsis microspora* yang diisolasi dari tanaman *Taxus andreanae*, *Taxus brevifolia*, dan *Taxus wallichiana* mampu menghasilkan metabolit anti kanker, paclitaxel. Selain itu, mikroba endofit diketahui menghasilkan senyawa antimalaria (*Colletotrichum* sp.), antioksidan (*Pestalotiopsis microspora*), antidiabet (*Pseudomassaria* sp.), immunosupresif (Lee and Lobkovsky, 1995).

Steroid adalah suatu senyawa yang berfungsi untuk meningkatkan metabolisme hormonal tubuh manusia sehingga menjadi lebih kuat. Namun jika dikonsumsi dalam jumlah berlebih dapat menimbulkan efek samping bagi kesehatan (Robbers et al. 1996). Steroid juga ditemukan berikatan dengan saponin yang memiliki aktifitas farmakologi yang cukup luas, diantaranya meliputi immunomodulator, antitumor, anti inflamasi, anti jamur, menghambat pertumbuhan sel-sel kanker, dan menurunkan kandungan kolesterol darah. Sterol adalah senyawa golongan steroid dengan rantai panjang (C27-C29). Identifikasi sterol dapat dilakukan dengan beberapa cara, sebagai berikut: sitosterol, kolesterol, dan stigmasterol dapat dipisah bila dikromatografi sebagai asetat pada pelat Anasil B (fase gerak heksana-eter : 97-3), sedangkan sterol umum dapat dipisahkan dari turunan dihidronya (misalnya sitosterol dari sitostanol) dengan Kromatografi Lapis Tipis AgNO₃, dengan menggunakan fase gerak CHCl₃, dan H₂SO₄-air (1:1) sebagai pendeteksi (Harborne 1996). Jenis sterol yang terdapat pada tumbuhan contohnya: kolesterol, stigmasterol, kampesterol, sitosterol, ergotamin (provitamin

D), dan 7-dehidrokolesterol. Kolesterol, stigmasterol, kampesterol, dan sitosterol dapat dipisahkan dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau Kromatografi Gas (GC) (Harborne 1996).

Penelitian ini bertujuan untuk menapis dan mengkarakterisasi bakteri endofit dari tanaman purwoceng yang bersifat antagonis terhadap sejumlah mikroba patogen (Enteropatogenik *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas pseudomallei*, dan *Candida albicans*), dan menghasilkan senyawa sterol.




BAHAN DAN METODE

Sampel tanaman purwoceng yang digunakan diambil dari beberapa daerah di Jawa Tengah dan Jawa Barat, dan sebagian telah disimpan secara *in vitro* (Tabel 1). Sampel tanaman yang diambil dari areal pertanian di lapang selanjutnya dipindahkan ke dalam polibag dengan media tanam tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 1:1. Tanaman purwoceng yang diambil secara morfologi memiliki tipe warna campuran. Eksperimen dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Badan Litbang Pertanian.

Isolasi, Pemurnian dan Penyimpanan Bakteri Endofit dari Tanaman Purwoceng

Bakteri endofit diisolasi dari bagian akar, batang dan daun tanaman purwoceng menurut James and Olivares (1998). Bagian-bagian tanaman dipisahkan, dan dicuci dengan akuades. Selanjutnya dicuci dengan akuades steril, digunting kecil-kecil dengan gunting yang telah disterilisasi. Permukaan bagian tanaman disterilisasi dengan cara direndam di dalam larutan HgCl₂ 0,2% sambil digoyang dalam shaker selama 30 menit untuk akar dan daun, 60 menit untuk batang. Kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 6 kali bilasan. Masing-masing bagian tanaman sebanyak ±20 gram dimasukkan ke dalam mortar, kemudian digerus hingga didapat air hasil gerusan dari masing-masing bagian tanaman. Air hasil gerusan tersebut diencerkan dengan pengenceran 10⁻¹ – 10⁻⁶, lalu diambil dari setiap hasil pengenceran sebanyak 100 µl untuk diinokulasikan ke dalam media King's B agar untuk mengisolasi bakteri endofit dan Humic Acid Vitamin (HV) agar untuk menapis koloni *Actinomycetes* (inkubasi 4-5 hari). Pemurnian dilakukan pada media International Streptomyces Project 2 (ISP-2) untuk *Actinomycetes* dengan menggunakan metoda kuadran. Koloni tunggal selanjutnya disimpan pada media agar miring King's B untuk bakteri endofit, dan khusus untuk *Actinomycetes* pada media Yeast Starch (YS). Penyimpanan jangka panjang dilakukan dengan teknik pengampulan (Liquid drying).

Tabel 1. Asal tanaman purwoceng sebagai sampel isolasi bakteri endofit
 Table 1. The origin of purwoceng as endophytic bacterial isolation samples

Nomor / Number	Asal tanaman / Plant origin	Foto sampel tanaman / Photo of plant samples
1.	Gunung putri (Jawa Barat)	
2.	Dieng (Jawa Tengah)	
3.	Tawangmangu (Jawa Tengah)	

Authentifikasi Isolat Bakteri Endofit Asal Tanaman Purwoceng

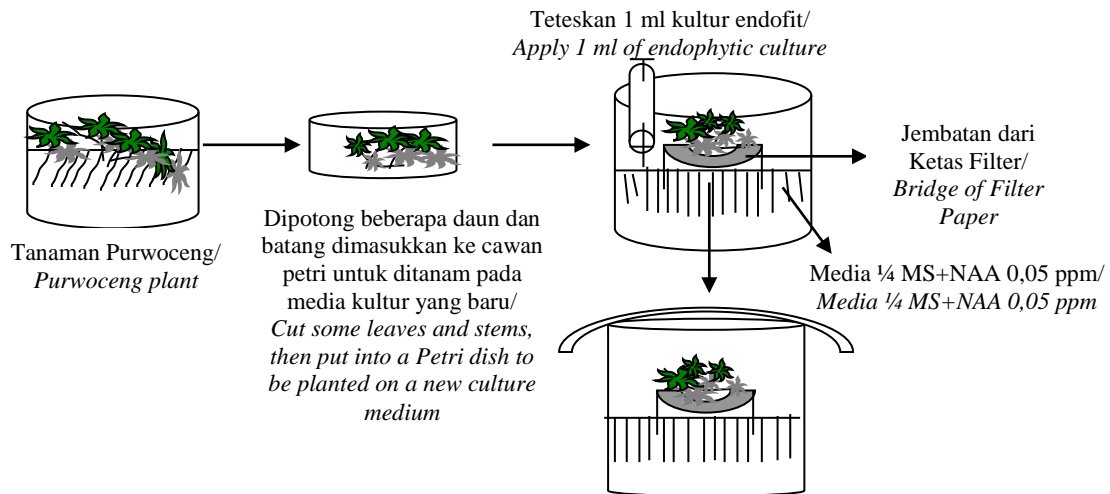
Isolat bakteri endofit yang telah diperoleh dari hasil isolasi tanaman purwoceng diinokulasikan ke media NB sebanyak 20 ml, kemudian dishaker dengan kecepatan 125 rpm selama 3 hari pada suhu kamar. Disamping itu dilakukan pembuatan media perakaran yaitu media MS (1/4 MS + NAA 0,5 ppm) dan di atas media dibuat jembatan dari kertas filter (Ding et al. 2017) yang dilakukan seperti pada gambar di bawah ini, sebagai tempat pertumbuhan kultur tanaman purwoceng.

Uji autentifikasi isolat *Actinomyces* endofit dilakukan dengan cara menginokulasikan kultur *Actinomyces* endofit yang berumur 3 hari ke tanaman purwoceng inangnya yang ditumbuhkan secara *in vitro*, masing-masing sebanyak 1 ml dengan menggunakan pipetman. Penggunaan kultur tanaman *in vitro* dimaksudkan untuk menjaga kondisi tanaman dari kontaminan lain selain kultur *Actinomyces* yang diinokulasikan dan hasil uji autentifikasi bisa lebih cepat diamati. Kultur *Actinomyces* endofit asal tanaman purwoceng dari pegunungan Dieng diinokulasikan ke tanaman purwoceng dari pegunungan Dieng dan kultur endofit asal tanaman purwoceng dari Gunung Putri diinokulasikan ke tanaman purwoceng yang berasal dari

Gunung Putri. Pengkulturan dilakukan selama 2 minggu di ruang kultur (9°C). Setelah 2 minggu, tanaman Purwoceng pada kultur *in vitro* dipotong dengan menggunakan gunting. Selanjutnya daun dan batang tanaman yang dipotong-potong dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril untuk diisolasi kembali bakteri endofitnya. Karakter morfologi dan biokimia dari bakteri endofit yang diperoleh dibandingkan dengan karakter isolat bakteri endofit awal yang diinokulasikan ke kultur tanaman purwoceng.

Preparasi, Ekstraksi, dan Analisis Senyawa Sterol dari *Actinomyces* Endofit dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Actinomyces endofit diinokulasikan pada media NB dan digoyang selama 3 hari. Kultur berumur 3 hari disentrifus pada kecepatan 18.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 15.000 rpm, selama 30 menit, untuk memisahkan senyawa antibakteri yang disekresikan ke dalam media tumbuhnya. Filtrat dipisahkan dari endapan, dan disaring dengan menggunakan filter milliphore 0,2 µm. Filtrat yang telah disaring kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 50 ml yang telah steril, dimasukkan ke dalam es kering, untuk mempercepat pembekuan filtrat ditambahkan alkohol 95%. Setelah itu dilakukan pengeringan dengan alat freeze dryer selama 2 hari.



Gambar 1. Authentifikasi Tanaman Purwoceng
Figure 1. Purwoceng Authentication

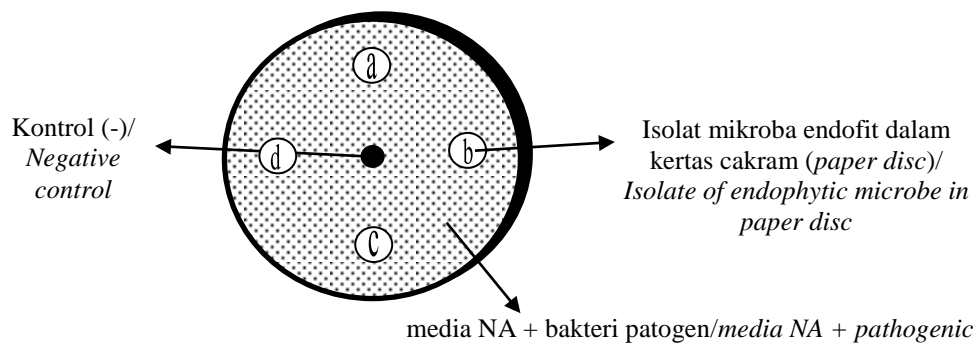
Filtrat yang telah kering siap diekstrak lebih lanjut senyawa sterolnya dan dianalisis dengan piranti (KLT). Ekstrak kultur mikroba endofit direndam di dalam methanol selanjutnya disaring menggunakan kertas saring. Ekstrak kasar disaring dengan silika gel silika gel G₆₀ GF 254 kemudian dipekatkan dengan evaporator. Eluen disiapkan berupa campuran khloroform : etanol = 49 : 1 dan ditambah 3 tetes etil asetat dalam *chamber* yang akan digunakan (20 x 20 cm) dan dijenuhkan untuk beberapa waktu. Sebanyak 5 µl ekstrak kasar ditotolkan ke atas lempeng/*plate* satu cm di atas batas bawah. Dan *plate* dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah jenuh dengan pelarut. Perjalanan eluen/pelarut diamati sampai 1 cm di batas atas *plate*. Lalu *plate* dikeluarkan, kemudian amati pemisahan komponen kimia dengan *scanner* kromatografi lapis tipis dan dibandingkan dengan standar.

Kadar senyawa kimia dapat dihitung dengan rumus:

$$\frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar}} \times [\text{standar}] \times \frac{\text{Volume pelarut}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \text{ (Lindsay, 1992)}$$

Uji Aktifitas Antipatogen terhadap *Staphylococcus aureus*, *Lysteria monocytogenes*, dan *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC)

Bakteri endofit dan bakteri patogen diinokulasikan pada media Nutrient Broth (NB) dan digoyang 1-2 hari pada suhu ruang, kecuali untuk *Staphylococcus aureus* dan *Enteropathogenic Escherichia coli* pada suhu 37° C. Kultur *Actinomyces* selanjutnya disentrifus selama 20 menit pada kecepatan 12000 rpm, dan diambil bagian supernatannya. Sebanyak 20 ml media NA (Nutrient Agar) yang telah dicairkan hingga suhu 40-45°C ditambahkan 200 µl kultur mikroba patogen (populasi sekitar 10⁷) dan dituangkan ke cawan petri steril. Selanjutnya disiapkan potongan kertas saring whatman steril (disc) berdiameter 6 mm untuk diletakkan di atas permukaan agar pada cawan Petri. Disc tersebut sebelum diletakkan terlebih dahulu dicelupkan pada filtrat bakteri endofit dengan menggunakan pinset steril. Inkubasi dilakukan selama 1-3 hari pada suhu 30° C. Potensi bakteri endofit sebagai antimikroba dapat dilihat dari zona yang terlihat. Bila pada media terlihat zona bening di sekeliling disc maka bakteri endofit dari tanaman purwoceng tersebut mempunyai potensi sebagai antimikroba.



Gambar 2. Posisi kertas cakram + isolat mikroba endofit dan bakteri patogen dalam pengujian antimikroba (metode difusi kertas cakram)

Figure 2. Position of disc paper + endophytic microbial isolates and pathogenic bacteria in antimicrobial testing (paper disc diffusion method)

Karakterisasi dan Identifikasi Isolat *Actinomycetes* Endofit Penghasil Senyawa Sterol dan Antipatogen

Actinomycetes endofit yang memiliki kandungan senyawa sterol dan berpotensi sebagai antipatogen terhadap *Staphylococcus aureus*, *Lysteria monocytogenes*, dan *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) dikarakterisasi dan diidentifikasi mengacu pada pedoman identifikasi bakteri (Bergey's. James et al. 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi, Pemurnian, dan Penyimpanan Bakteri Endofit dari Tanaman Purwoceng

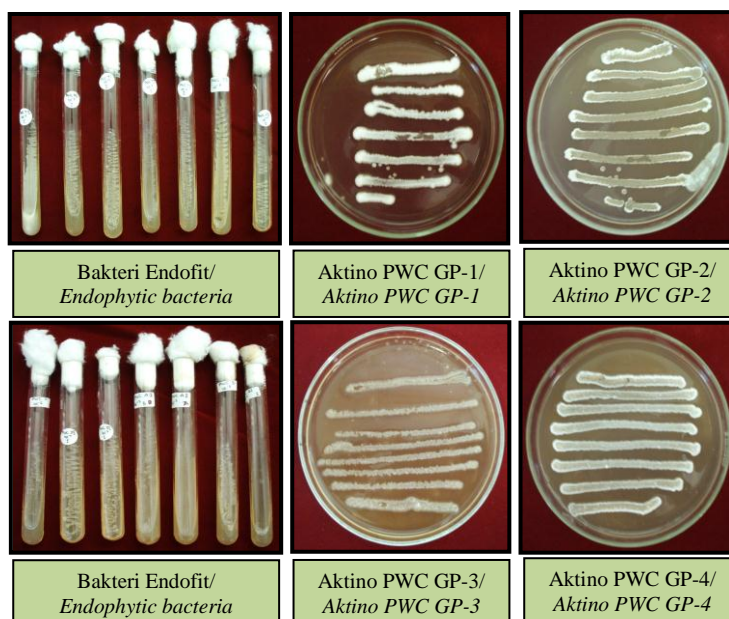
Sebanyak 49 isolat bakteri endofit termasuk di dalamnya *Actinomycetes* endofit berhasil diisolasi dari tanaman purwoceng yang diambil dari Gunung Putri, dataran tinggi Dieng, dan Tawangmangu ditunjukkan pada Tabel 2. *Actinomycetes* endofit hanya diperoleh dari tanaman purwoceng yang diambil dari Gunung Putri.

Menurut Huang et al. (2007) hampir 300.000 spesies tanaman di muka bumi ini, setiap tanaman memiliki satu atau lebih spesies endofit yang bervariasi. Ada keterkaitan yang kompleks antara endofit dan tanaman inangnya, yaitu endofit secara tidak langsung menguntungkan bagi pertumbuhan tanaman dengan menghasilkan metabolit sekunder. Menurut Yu et al. (2010) peluang mendapatkan bakteri endofit yang dapat menghasilkan senyawa aktif potensial diperoleh dari sumber tanaman tertentu diantaranya tanaman obat tradisional yang sering digunakan di masyarakat. Beberapa peneliti juga telah melakukan isolasi endofit dengan aktivitas antimikroba dari sejumlah tanaman seperti ginseng (*Panax ginseng*), lumut hati (*Scapania verrucosa*), dan tanaman obat Cina *Rehmannia glutinosa* (Guo et al. 2008; Xu et al. 2009; You et al. 2009).

Pada umumnya isolat bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari tanaman purwoceng memiliki bentuk koloni cembung, berwarna putih, bening dan berlendir, sedangkan pada golongan *Actinomycetes* memiliki warna putih, kering dan menempel pada permukaan media tumbuh.

Tabel 2. Hasil isolasi bakteri endofit asal tanaman purwoceng
Table 2. Result of isolation of endophytic bacteria from purwoceng

Nomor / Number	Daerah asal tanaman purwoceng / The origin of purwoceng plant	Jenis / Type	Jumlah isolat / Number of isolates	Kode isolat / Code isolates
1.	Gunung Putri, Bogor	Bakteri <i>Actinomycetes</i>	11	Endo PWC GP-1 sampai Endo PWC GP-11
2.	Dieng, Jawa Tengah	Bakteri	4	Aktino PWC GP-1 sampai Aktino PWC GP-4
3.	Tawangmangu, Jawa Tengah	Bakteri	10	Endo PWC D-1 sampai Endo PWC D-10
4.	<i>In-vitro</i> Gunung Putri, Bogor	Bakteri	8	Endo PWC TWM-1 sampai Endo PWC TWM-8
5.	<i>In-vitro</i> Dieng, Jawa Tengah	Bakteri	9	Endo PWCI.GP-1 sampai Endo PWCI.GP-9
			7	Endo PWCI.D-1 sampai Endo PWCI.D-7
Jumlah			49	



Gambar 3. Morfologi dari beberapa isolat mikroba endofit
Figure 3. Morphology from some endophyte microbial isolates

Menurut (Alvin et al. 2014) eksplorasi mikroba endofit dari tanaman obat dapat meningkatkan peluang mendapatkan senyawa baru (novel). Mikroba endofit memiliki hubungan yang saling menguntungkan dengan tanaman inangnya. Mikroba endofit dapat berperan meningkatkan ketahanan tanaman terhadap mikroba fitopatogen dengan mekanisme mengeluarkan metabolit yang bersifat antagonis terhadap patogen atau bisa melisis dinding sel patogen dari kelompok cendawan atau bahkan secara tidak langsung menginduksi mekanisme ketahanan inang atau memacu pertumbuhan. Mikroba endofit juga dapat menghasilkan metabolit sekunder yang sama atau serupa dengan inangnya. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh tanaman bersama dengan mikroba endofitnya diantaranya obat anti kanker camptothecin (Puri et al. 2005) dan senyawa antikanker yang mengarah ke podophyllotoxin (Puri et al. 2006). Asosiasi biologis yang dekat antar mikroba endofit dan tanaman inangnya menghasilkan sejumlah besar dan beragam molekul biologis dibandingkan dengan mikroba epifit dan rhizosfer (Strobel 2003).

Preparasi, Ekstraksi, dan Analisis Senyawa Sterol dari *Actinomycetes* Endofit dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis sterol dilakukan dengan KLT, karena KLT memiliki keunggulan diantaranya analisis ini dititikberatkan untuk analisis analit-analit dengan kadar sangat kecil yang perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu dengan KLT. Metode ini banyak digunakan dalam analisis kualitatif maupun kuantitatif di bidang farmasi terutama di bidang analisis obat bahan alam. Kromatografi ini merupakan cara pemisahan campuran senyawa menjadi senyawa murninya dan mengetahui kuantitasnya. Keunggulan lainnya dengan KLT adalah lebih mudah dan lebih murah pelaksanaannya daripada kromatografi kolom. Peralatan yang digunakan lebih sederhana dan dapat dikatakan hampir semua laboratorium dapat melaksanakan setiap saat secara cepat. Beberapa keuntungan lainnya adalah identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi atau dengan radiasi menggunakan sinar ultraviolet; dapat dilakukan elusi secara menaik (*ascending*), menurun (*descending*), atau dengan cara elusi 2 dimensi; dan ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak (Gandjar and Rohman 2007).

Sebanyak 16 isolat bakteri endofit dipilih berdasarkan perbedaan morfologi koloninya (morfotipenya) untuk dilakukan analisis kandungan senyawa sterolnya, yaitu Endo PWC GP-1, Endo PWC GP-2, Endo PWC GP-4, Endo PWC D-1, Endo PWC D-4, Endo PWC D-5, Endo PWC TWM-1, Endo PWC TWM-2, Endo PWC TWM-3, Endo PWC I.GP-1, Endo PWC I.GP-3, Endo PWC I.D-1, Endo PWC I.D-2, Aktino PWC GP-1, Aktino PWC GP-2, dan Aktino PWC GP-4. Setelah dilakukan analisis diperoleh 1 isolat yang memiliki potensi sebagai penghasil senyawa sterol (sitosterol, stigmasterol, saponin, bergapten) yaitu Endo PWC I.GP-1 yang berasal dari tanaman *in-vitro*

Gunung Putri. Isolat-isolat lain kemungkinan aktivitas menghasilkan senyawa sterol sangat kecil sehingga tidak terdeteksi setelah diukur dengan TLC scanner. Senyawa saponin berguna untuk menghambat pertumbuhan sel-sel kanker pada kolon dan menurunkan kandungan kolesterol darah. Aktivitas spesifik saponin meliputi aktivitas yang berhubungan dengan kanker (sitotoksik, kemopreventif, antimutagen), dan yang menyangkut aktivitas antitumor, antiinflamatori dan antialergenik, imunomodulator, antivirus, antihepatotoksik, antidiabetes, antifungi, dan molusisidal (Lacaille-Dubois and Wagner 1996). Adanya kandungan senyawa steroid yang dihasilkan oleh bakteri endofit tersebut membuka peluang untuk memproduksi senyawa steroid dan saponin menggunakan kultur bakteri endofit dari tanaman purwoceng. Beberapa peneliti juga berhasil mendapatkan mikroba penghasil senyawa steroid dari mikroba endofit kelompok kapang, yaitu *Colletotrichum* sp. dari *Artemisia annua* dan *Nodulisporium* sp. dari *Juniperus cedre*. Senyawa steroid yang dihasilkan dari kapang endofit tersebut memiliki aktivitas antimikroba moderat, sehingga sulit dikembangkan sebagai obat atau pestisida yang efektif (Lu et al. 2000; Dai et al. 2006). Hasil analisis kandungan senyawa sterol dengan menggunakan KLT *scanner* disajikan pada Tabel 3.

Eksplorasi tanaman purwoceng untuk memproduksi senyawa afrodisiak memiliki kendala karena populasi tanaman purwoceng yang sangat sedikit dan kebanyakan tanaman purwoceng hanya mampu tumbuh di dataran-dataran tinggi saja. Tanaman purwoceng tumbuh secara endemik di daerah pegunungan, dan hingga saat ini sebagian besar hanya tersisa di dataran tinggi Dieng, Jawa Tengah (Syahid et al. 2005). Di samping itu, kultur sel tumbuhan secara *in vitro* atau kultur jaringan (termasuk kultur kalus dan kultur akar) secara ekstensif untuk produksi massal metabolit sekunder tanaman (Mulabagal and Tsay 2004; Srivastava and Srivastava 2007). Namun, keterbatasan dengan teknologi sel tumbuhan dan kultur jaringan meliputi ketidakstabilan genomik, rendemen rendah, dan kesulitan untuk peningkatan skala yang berpengaruh pada hanya ada sedikit kisah sukses di level industri, seperti produksi taxol oleh Phyton Biotech dan produksi shikonin, ginseng dan berberine oleh Mitsui Chemicals (Linden 2006). Menurut (Venugopalan and Srivastava 2015), fermentasi mikroba untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder memiliki keuntungan tertentu dibandingkan dengan kultur sel tanaman. Media tumbuh kultur mikroba relatif lebih sederhana dan murah, biasanya merupakan produk samping atau limbah industri seperti cairan dari ekstrak jagung dan molase/tetes tebu. Media untuk kultur sel tanaman membutuhkan bahan aditif dengan biaya mahal seperti fitohormon sehingga meningkatkan biaya produksi. Kecepatan pertumbuhan mikroba yang lebih cepat membuat periode fermentasi lebih pendek dengan risiko kontaminasi lebih rendah dibandingkan dengan sel tanaman/kultivasi jaringan yang tumbuh lambat. Optimalisasi, pengaturan parameter fermentasi dan peningkatan skala relatif lebih mudah pada fermentasi

mikroba jika dibandingkan sel tanaman/kultivasi jaringan di bioreaktor. Di samping itu, kultur mikroba lebih mudah untuk membuat strategi peningkatan dengan cara perbaikan strain, penambahan prekursor atau elisitor atau inhibitor, dan kokultivasi (Zhao et al. 2010). Fermentasi mikroba endofit dapat mengurangi ancaman panen tanaman yang berlebihan sambil memastikan pasokan metabolit sekunder tanaman penting yang stabil terlepas dari kondisi lingkungan.

Menurut Quin and Schmidt-Dannert (2014) ada peningkatan permintaan untuk memproduksi berbagai macam molekul skala industri dengan mikroba sehubungan dengan kecepatan dan lebih murah. Saat ini mikroba dapat didisain dan direkayasa untuk tujuan biosintesis tertentu berkat perkembangan *genome sequencing*, rekayasa metabolik, dan sintetik biologi. Peralatan untuk melakukan manipulasi genetik mikroba untuk menciptakan rangkaian metabolisme baru dan membuat produk baru yang dapat diakses sudah tersedia. Teknologi baru ini dapat memfasilitasi mikroba yang telah direkayasa untuk

melakukan biosintesis. Dengan demikian eksplorasi potensi mikroba merupakan tahapan penting untuk kegiatan tersebut.

Uji Aktifitas Antipatogen terhadap *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* dan *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC)

Uji aktivitas antipatogen terhadap 16 isolat bakteri endofit menunjukkan bahwa ada beberapa isolat dan salah satunya Endo PWC I.GP-1 yang memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, dan *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling kertas cakram yang mengandung isolat bakteri endofit, dengan lebar zona maksimal 8 mm (Endo PWC GP-2) terhadap *Enteropathogenic Escherichia coli* dan minimal sebesar 2 mm (Endo PWC D-1) terhadap *Enteropathogenic Escherichia coli*. Hasil pengujian skrining antibakteri disajikan pada Tabel 4.

Tabel 3. Hasil analisis ekstrak isolat mikroba endofit menggunakan KLT Scanner
Table 3. Results of extract analysis from microbial endophyte isolate using TLC Scanner

Nomor / Number	Kode isolat / Code of isolates	Morfologi koloni / Colony morphology	Konsentrasi (%) / Concentration (%)			
			Sitosterol / Sitosterol	Stigmasterol / Stigmasterol	Saponin / Saponin	Bergapten / Bergapten
1	Endo PWC I.GP-3	Cembung, putih, opa, berlendir	-	-	-	-
2	Endo PWC I.D-2	Cembung, putih, opa, berlendir	-	-	-	-
3	Aktino PWC GP-1	Putih, kering	-	-	-	-
4	Endo PWC D-4	Cembung, putih kekuningan, berlendir	-	-	-	-
5	Endo PWC TWM-2	Cembung, putih, opa, berlendir	-	-	-	-
6	Endo PWC D-5	Cembung, putih, opa, berlendir	-	-	-	-
7	Endo PWC GP-4	Cembung, putih, opa, berlendir	-	-	-	-
8	Endo PWC TWM-1	Cembung, putih transparan, berlendir	-	-	-	-
9	Aktino PWC GP-2	Putih, kering	-	-	-	-
10	Endo PWC GP-1	Cembung, krem, berlendir	-	-	-	-
11	Aktino PWC GP-4	Putih, kering	-	-	-	-
12	Endo PWC I.D-1	Cembung, putih, opa, berlendir	-	-	-	-
13	Endo PWC GP-2	Cembung, putih, opa, berlendir	-	-	-	-
14	Endo PWC D-1	Cembung, putih kekuningan, berlendir	-	-	-	-
15	Endo PWC I.GP-1	Cembung, putih, opa, berlendir	1,468	1,004	3,203	0,713
16	Endo PWC TWM-3	Cembung, putih transparan, berlendir	-	-	-	-

Tabel 4. Uji antipatogen dari ekstrak isolat bakteri endofit tanaman purwoceng
Table 4. Antipatogenic test from extract of purwoceng endohytic bacteria

Nomor / Number	Kode isolat / Code isolates	Zona bening (mm) / Clear zone (mm)		
		<i>S. aureus</i> / <i>S. aureus</i>	EPEC / EPEC	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. monocytogenes</i>
1	Endo PWC I.D-2	-	3	-
2	Aktino PWC GP-2	4	7	-
3	Aktino PWC GP-4	-	2	-
4	Endo PWC GP-2	-	8	-
5	Endo PWC D-1	-	2	-
6	Endo PWC I.GP-1	-	3	-

Keterangan: (+) = Menunjukkan adanya zona bening (Indicate a clear zone)
(-) = Tidak menunjukkan adanya zona bening (Not indicate a clear zone)

EPEC: *Enteropathogenic Escherichia coli*
S. aureus: *Staphylococcus aureus*
L. monocytogene: *Listeria monocytogenes*

Dari tabel di atas dapat dilihat bahwa ada beberapa isolat yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen, yaitu: Endo PWC I.D-2, Aktino PWC GP-4, Endo PWC GP-2, Endo PWC D-1, Endo PWC I.GP-1 terhadap *Enteropathogenic Eschericia coli*, dan Aktino PWC GP-2 terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Enteropathogenic Eschericia coli*. Tidak satu isolat pun yang memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Listeria monocytogenes* hal ini bisa disebabkan tidak adanya kandungan senyawa aktif dari tanaman purwoceng yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri tersebut. Sedangkan kandungan senyawa aktif yang berfungsi sebagai penghambat pertumbuhan bakteri patogen (*Enteropathogenic Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*) juga belum diketahui jenis maupun golongan senyawanya, untuk itu perlu dilakukan uji lebih lanjut untuk mengetahui jenis dan golongan dari senyawa aktif ini.

Adanya zona bening di sekitar *paper disk* menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri patogen di sekitar *paper disk* yang telah mengandung isolat bakteri endofit. Hal ini terjadi karena adanya senyawa (zat aktif) yang menghambat pertumbuhan dari bakteri patogen. Semakin luas (besar) zona yang dihasilkan berarti semakin banyak zat aktif yang terkandung dalam isolat bakteri endofit tersebut.

Karakterisasi dan Identifikasi Isolat *Actinomycetes* Endofit Penghasil Senyawa Sterol dan Antipatogen

Berdasarkan hasil analisis kandungan sterol dan uji antipatogen terhadap *Staphylococcus aureus*, *Enteropathogenic Eschericia coli*, dan *Listeria monocytogenes* diketahui ada isolat bakteri endofit tanaman purwoceng yang memiliki potensi keduanya, yaitu isolat Endo PWC I.GP-1. Hasil pewarnaan Gram terhadap isolat Endo PWC I.GP-1 menunjukkan sel bakteri berbentuk batang berwarna ungu, yang berarti termasuk ke dalam kelompok bakteri Gram positif. Hasil pengujian secara biokimia yang meliputi uji Katalase, Oksidase, uji penggunaan *citrate*, uji gula-gula ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil karakterisasi biokimia dan fisiologis isolat Endo PWC I.GP-1

Table 5. Results of biochemical and physiological characterization of Endo PWC I.GP-1 isolate

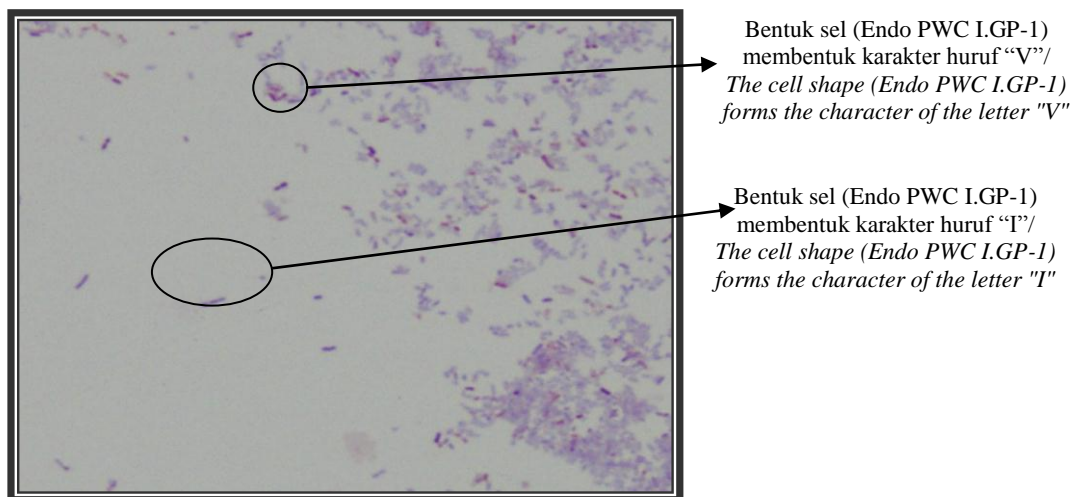
Karakterisasi / Characterization	Hasil / Results
Jenis Gram dan bentuk sel	Positif, batang
Uji Katalase	+
Uji Oksidase	-
Acid From Glukosa	-
Uji VP	-
Uji Urea	+
Uji Reduksi Nitrat	+
Laktosa	-
Maltosa	+
Mannitol	-
Sukrosa	-
Trehalosa	-
Jenis bakteri	<i>Corynebacterium</i> sp.

Keterangan:

(+) = menunjukkan adanya kandungan senyawa uji karakterisasi (*indicate the content of the characterization test compound*)

(-) = menunjukkan tidak adanya kandungan senyawa uji karakterisasi (*indicate the absence of the content of the characterization test compound*)

Isolat bakteri endofit PWC I.GP-1 menunjukkan karakter positif pada beberapa uji yaitu pada uji katalase, urea, reduksi nitrat, dan maltosa, sedangkan pada uji yang lainnya menunjukkan hasil negatif. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri endofit yang dikarakterisasi merupakan bakteri Gram positif. Setelah dilakukan uji lanjut didapat kesimpulan bahwa isolat bakteri endofit ini adalah jenis dari *Corynebacterium* sp. *Corynebacterium* sp. merupakan filum Actinobacteria yang banyak ditemukan pada tumbuhan dan hewan. Biasanya untuk uji karakterisasi ini dilakukan uji pemeriksaan granul yaitu dengan penambahan pereaksi Neisser, ditandai dengan terdapatnya granul warna ungu lembayung pada ujung sel bakteri dan biasanya sel-sel tersebut akan menunjukkan karakter-karakter huruf tertentu seperti huruf M, V, N, I, L, U (Bernard and Funke 2015).



Gambar 4. Bentuk mikroskopik bakteri endofit hasil pewarnaan gram (pembesaran 1000 kali)
Figure 4. Microscopic form of purwoceng endophytic bacteria (1000x enlargement)

KESIMPULAN

Sebanyak 49 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari tanaman purwoceng dari Gunung Putri, dataran tinggi Dieng, Tawangmangu, dari tanaman purwoceng yang telah disimpan secara *in vitro*. Hasil pengujian kandungan senyawa sterol (sitosterol, stigmasterol, saponin, bergapten) dan pengujian antipatogen terhadap *Staphylococcus aureus*, *Enteropathogenic Escherichia coli*, dan *Listeria monocytogenes* diperoleh isolat yang memiliki kedua potensi tersebut, yaitu Endo PWC I.GP-1. Hasil identifikasi lebih lanjut diketahui bahwa isolat Endo PWC I.GP-1 tergolong ke dalam bakteri Gram positif berbentuk batang, dengan jenis *Corynebacterium* sp. Sejumlah isolat bakteri endofit mampu mencegah pertumbuhan bakteri patogen yaitu: Endo PWC I.D-2, Aktino PWC GP-4, Endo PWC GP-2, Endo PWC D-1, Endo PWC I.GP-1 semua dapat menghambat pertumbuhan *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), sedangkan Aktino PWC GP-2 dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC).

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada Siti Aminah dan Jajang Kosasih yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvin, A., Miller, K.I. & Neilan, B.A. (2014) Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiological research*, 169(7), pp.483–495.
- Bergey's. James, T. Staley, T. Stanley & W. (1994) *Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edit., A Waverly Company. USA.
- Bernard, K.A. & Funke, G. (2015) *Corynebacterium*. In *Dalam: William B. Whitman (ed). Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley and Sons Inc.
- Dai, J., Krohn, K., Florke, U., Draeger, S., Schulz, B., Kiss-Szikszai, A., Antus, S., Kurtan, T. & vanRee, T. (2006) Metabolites from the endophytic fungus *Nodulisporium* sp. from *Juniperus cedre*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2006(15), pp.3498–3506.
- Ding, C., Wang, Q.B., Guo, S. & Wang, Z. (2017) The improvement of bioactive secondary metabolites accumulation in *Rumex gmelini* Turcz through co-culture with endophytic fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, pp.1–8.
- Endang, G., Mariska, I., & Sukmadjaja, D. (1990) *Tanaman obat*, Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Gandjar, I.G. & Rohman, A. (2007) *Kimia farmasi analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, 224, p.228.
- Guo, L., Wu, J., Han, T., Cao, T., Rahman, K., & Qin, L. (2008) Chemical composition, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Scapania verrucosa* Heeg. and its endophytic fungus *Chaetomium fusiforme*. *Molecules*, 13(9), pp.2114–2125.
- H Lu, WX Zou, JC Meng, J Hu, R.T. (2000) New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant science*, 151(1), pp.67–73.
- Harborne, J.B. (1996) *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Penerbit ITB. Bandung.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath P.H.A., Staley, J.T., & William, S.T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edit., A Waverly Company. USA.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Xing J., Corke, H., & Sun, M. (2007) A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Economic Botany*, 61(1), pp.14–30.
- James, E.K. & Olivares, F.L. (1998) Infection and Colonization of Sugar Cane and Other Gramineous Plants by Endophytic Diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(1), pp.77–119.
- Lee, J.C., Lobkovsky E., & Pliam, N.B. (1995) Subglutinols A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *The Journal of Organic*, 60, pp.7076–7077.
- Linden, J.C. (2006) Secondary products from plant tissue culture. *Encycl. Life Support Syst. (UNESCO-EOLSS) Biotechnol*, 4, pp.1–9.
- Lu, H., Zou, W.X., Meng, J.C., Hu, J., & Tan, R.X. (2000) New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science*, 151(1), pp.67–73.
- Lacaille-Dubois, M.A., & Wagner, H. (1996) A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, 2(4), pp.363–386.
- Mulabagal, V. & Tsay, H.-S. (2004) Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Int J Appl Sci Eng*, 2(1), pp.29–48.
- Puri, S.C., Verma, V., Amna, T., & Qazi, G.N. (2005) An Endophytic Fungus from *Nothapodytes foetida* that Produces Camptothecin. *Journal of natural products*, 68(12), pp.1717–1719.
- Puri, S.C., Nazir, A., Chawla, R., & Arora, R. (2006) The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. *Journal of Biotechnology*, 122(4), pp.494–510.

- Quin, M.B. & Schmidt-Dannert, C. (2014) Designer microbes for biosynthesis. *Current opinion in biotechnology*, 29, pp.55–61.
- Robbers, J. E., Speedie, M.K., & V.E.Tyler, V.E. (1996) *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*, William & Wilkins. Pennsylvania.
- Srivastava, S. & Srivastava, A.K. (2007) Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1), pp.29–43.
- Strobel, G.A. (2003) Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and infection*, 5(6), pp.535–544.
- Strobel G, & Daisy, B. (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 67(4), pp.491–402.
- Syahid, S.F., Rostiana, O. & Miftakhurahmah (2005) Pengaruh NAA dan IBA terhadap Perakaran Purwoceng (*Pimpinella Pruatjan Molk.*) 77V *Vitro. Jumal Littri*, 11(4), pp.146–151.
- Tan, R.X. & Zou, W.X. (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports*, 18(1993), pp.448–459.
- Venugopalan, A. & Srivastava, S. (2015) Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 33(6), pp.873–887.
- Xu, L. L., Han, T., Wu, J.Z., Zhang Q.Y., Zhang, H., & Huang, B.K. (2009) Comparative research of chemical constituents, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Panax ginseng* and its endophytic fungus. *Phytomedicine*, 16(6), pp.609–616.
- You, F., Han, T., Wu, J., Huang, B., & Qin, L. (2009) Antifungal secondary metabolites from endophytic *Verticillium* sp. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(3), pp.162–165.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zhang, C., Guo, L., Li, W., & Sun, P. (2010) Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, 165(6), pp.437–449.
- Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., & Zhong, L. (2010) Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Curr Res, Technol Educ Trop Appl Microbiol Microbial Biotechnol*, 1, pp.567–576.