

Antimicrobial Activity of Pomegranate's Endophytic Bacteria Against Pathogenic Microbes

Putri Alfianti Sriwinahyu¹, Prapti Sedijani^{1*}, Lalu Zulkifli¹

¹ Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Mataram, Indonesia

Article History

Received : October 11th, 2020

Revised : October 22th, 2020

Accepted : November 13th, 2020

Published : November 26th, 2020

*Corresponding Author:

Prapti Sedijani,

Program Studi Pendidikan
Biologi FKIP Universitas
Mataram

Email:

praptisedijani@unram.ac.id

Abstract: White pomegranate (*Punica granatum* L.) is one of potential plant that can be use as an antimicrobial. The objective of this study was to determine antimicrobial activity of endophytic bacteria from white pomegranate (*Punica granatum* L.) in inhibiting the growth of pathogenic microbia (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Fusarium* sp. fungi). The stages of the research were isolation endophytic bacteria, antimicrobial assay, and characterization of potential endophytic bacterial. Endophytic bacterial were isolated from bark, leaves, flower, and fruit peel of white pomegranate taken from Gebang Baru, Mataram District. Antimicrobial assay was then performed using agar diffusion method, using supernatant of endophytic bacteria, water as negative control or ciprofloxacin as positive control. The potential isolates were characterized using Gram staining and biochemical test. The results showed that 2 endophytic bacterial isolates (DNX2 and BNG1) show strong activity against *S. aureus*, 3 endophytic bacterial isolates (BTG1, DNX11, and BNG1) show strong activity against *S. dysenteriae*, and 1 isolate KLBX11 shows medium activity against *Fusarium* sp. fungi. Those isolates are gram-positive with bacill-shaped and produce spores. It can be concluded that it is possible to obtain potential endophytic bacterial from white pomegranate are potential as an alternative source for antimicrobial compounds.

Keywords: Antimicrobial; Endophytic Bacteria; *Punica granatum* L.

Pendahuluan

Usaha dalam mengendalikan pertumbuhan mikroba patogen sampai saat ini masih menggunakan bahan-bahan kimia yang dapat menimbulkan dampak setelahnya. Kemenkes RI memperkirakan bahwa tahun 2050 angka kematian akibat resistensi mikroba patogen akan terus meningkat. Sedangkan penggunaan pestisida yang berlebih menimbulkan resurgensi hama, patogen kedua dan menyebabkan ekosistem akan terganggu (Nurhayati, 2011). Salah satu inovasi yang dapat dilakukan ialah dengan penemuan senyawa antibiotik alternatif dari sumber alam seperti tanaman.

Delima putih (*Punica granatum* L.) adalah salah satu tanaman yang dipercaya memiliki potensi sebagai antimikroba dan sering digunakan oleh masyarakat sebagai obat dan kepentingan industri. Seluruh bagian tanaman delima putih seperti pada bagian daun, bunga, biji dan kulit buah dapat digunakan untuk penyakit kanker, inflamasi kulit, kolesterol, gangguan pada sistem sirkulasi dan beberapa penyakit lainnya akibat

infeksi mikroba patogen seperti pada saluran pencernaan dan saluran pernapasan (Suman and Prerak, 2019). Hal itu disebabkan tanaman delima putih mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder seperti asam organik, alkaloid, polifenol, flavonoid, antosianin, asam lemak dan vitamin (Moghaddam *et al.*, 2018).

Senyawa metabolit sekunder merupakan produk yang dihasilkan oleh mikroba endofit dan juga tanaman inangnya (Compean and Ynalves, 2014). Secara molekuler, asosiasi yang terbentuk antar keduanya memungkinkan terjadinya transfer materi genetik, sehingga senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh inangnya ternyata juga dihasilkan oleh mikroba endofit yang terdapat didalam inangnya (Strobel, 2003). Senyawa metabolit sekunder memiliki kemampuan seperti antimikroba, antiinflamasi dan berguna dalam mempertahankan diri dari lingkungan yang kurang menguntungkan (Agustina *et al.*, 2016). Laporan spesifik mengenai aktivitas antimikroba bakteri endofit tanaman delima putih dalam melawan mikroba patogen

sampai saat ini belum ditemukan sebab hanya sebatas pada isolasi dan identifikasi. Namun banyak penelitian terlebih dahulu yang menggunakan ekstrak tanaman delima putih menunjukkan potensinya sebagai antimikroba. Beberapa laporan yang mendukung hal tersebut seperti penelitian yang dilakukan oleh Blegur and Antonius (2016) yang menggunakan ekstrak etanol kulit batang delima putih mampu menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*. Sedang laporan hasil penelitian yang dilakukan oleh Rongai *et al.* (2016) dengan menggunakan ekstrak kulit buah delima mampu menghambat pertumbuhan jamur *Fusarium oxysporum*. Hal inilah yang melatar belakangi peneliti untuk mengetahui potensi antimikroba dari bakteri endofit pada tanaman delima putih melalui teknik isolasi bakteri endofit. Melalui teknik tersebut diharapkan mampu melawan infeksi mikroba patogen yang menyebabkan gangguan pada manusia maupun pada tumbuhan. Keuntungan lain yakni tidak merusak tanaman yang akan digunakan, sebab biomassa yang dipakai tidak sebanyak saat ekstraksi dilakukan.

Adapun mikroba patogen yang dipilih yakni bakteri *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Shigella dysenteriae*, dan *Klebsiella pneumoniae* serta jamur *Fusarium sp.* Bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri penyebab infeksi saluran pernapasan pada paru-paru begitu pula dengan *Klebsiella pneumoniae*, dan *Streptococcus viridans* namun pada tenggorokan (Ariyanti *et al.*, 2003). *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri yang menginfeksi saluran pencernaan dan menyebabkan diare (Entjang, 2003). Berbeda dengan bakteri, salah satu jamur patogen yang berbahaya yaitu *Fusarium sp.* yang mampu menyebabkan penyakit layu fusarium pada tanaman. Gejala sekunder ini disebabkan oleh toksin dan enzim yang dihasilkan oleh jamur tersebut. Oleh sebab itu upaya pengendalian yang dapat dilakukan ialah dengan penggunaan agensi pengendali hayati seperti bakteri endofit (Semangun, 2006).

Dari uraian diatas maka peneliti bertujuan untuk mengisolasi bakteri endofit yang terdapat pada tanaman delima putih (*Punica granatum L.*) yang berpotensi sebagai antibiotik dan fungsida alternatif dalam melawan mikroba patogen serta melakukan karakterisasi bakteri endofit yang menunjukkan kemampuannya sebagai antimikroba.

Bahan dan Metode

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei-September 2019 yang bertempat di Laboratorium Biologi dan Mikrobiologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Mataram. Isolasi bakteri

endofit tanaman delima putih dilakukan dengan memotong bagian kulit batang, daun, bunga dan kulit buah lalu dibersihkan dengan air mengalir. Selanjutnya difiksasi dengan alkohol 70% selama 1 menit dan larutan sodium hipoklorit (NaOCL) 4% selama 2 menit serta dibilas dengan aquades steril. Selanjutnya eksplan yang sudah bersih diletakkan didalam cawan petri yang berisi kertas saring steril dan dikeringkan didalam laminar air flow. Selanjutnya eksplan ditanam pada media NA dan diinkubasi pada suhu 34°C selama 24 jam. Isolat bakteri yang tumbuh pada sekitar eksplan dimurnikan menggunakan metode tuang (*Pour Plate*) lalu diinkubasi selama 24-48 jam dengan suhu 34°C hingga diperoleh isolat murni.

Kultur bakteri endofit yang akan digunakan ditumbuhkan pada media NB yang telah disterilkan lalu diinkubasi pada suhu 34°C selama 24 jam. Setelah itu divortex dengan kecepatan sedang selama 48 jam pada suhu 34°C kemudian setiap isolat disetarakan bobotnya dengan menimbanginya sebelum disentrifuse. Setelah penimbangan, isolat bakteri endofit disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit dan supernatant yang diperoleh dipindahkan kedalam tabung reaksi yang steril sebagai bahan aktivitas antimikroba.

Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode difusi agar sebanyak 5 sumuran dalam satu cawan petri dengan diameter sumuran sebesar 6 mm. Mikroba uji (*S. aureus*, *S. viridians*, *S. dysenteriae*, dan *Fusarium sp.*) yang digunakan pada konsentrasi 3×10^7 sel/ml sebanyak 2 ml disebar pada 18 ml media Muller Hinton agar dengan merata dan ditunggu sampai memadat lalu pada setiap sumuran diisi dengan 20 μ l kontrol positif (ciprofloxacin), kontrol negatif (aquades steril), dan supernatant kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 34°C.

Kriteria zona hambat yang digunakan berdasarkan klasifikasi respon hambat pertumbuhan bakteri Suriawiria (2005) yang dikelompokkan kedalam 4 kategori yaitu kategori lemah dengan zona hambat ($\phi < 5$ mm), kategori sedang dengan zona hambat ($\phi 5 - 10$ mm), kategori kuat dengan zona hambat ($\phi > 10 - 19$ mm), dan kategori sangat kuat dengan zona hambat ($\phi \geq 20$ mm).

Karakterisasi dilakukan pada isolat bakteri endofit potensial dilihat dari segi bentuk, warna, elevasi, tepi koloni bakteri endofit. Pengecatan Gram dilakukan untuk melihat bentuk sel serta pengelompokkan jenis bakteri gram positif atau negatif. Tes biokimia yang dilakukan adalah uji Simmons sitrat, TSI, indole, fermentasi karbohidrat (glukosa, maltose, manitol, dan fruktosa) serta motilitas mengacu pada buku *Microbiology: A Laboratory Manual* (Cappuccino & Sherman, 2014).

Hasil dan Pembahasan

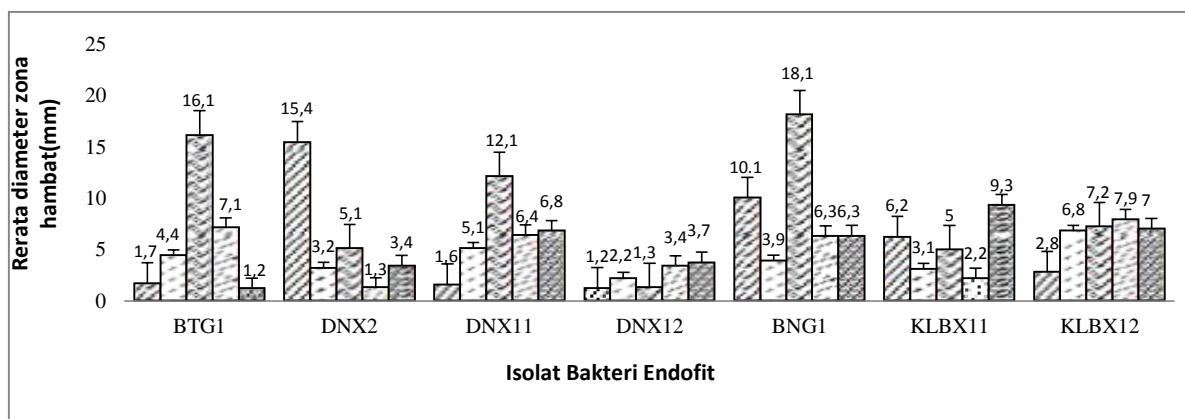
Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Endofit

Hasil yang diperoleh dari uji aktivitas antimikroba bakteri endofit terhadap mikroba uji memiliki kategori kekuatan yang berbeda-beda, selengkapnya data disajikan pada Gambar 1 dan Gambar 2. Kategori kekuatan tersebut dideterminasi melalui zona bening (*clear zone*) yang terbentuk disekitar sumuran. Dari 7 isolat bakteri endofit yang diperoleh sebanyak 2 isolat bakteri endofit memiliki aktivitas kuat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kode isolat DNX2 dan BNG1. Tiga isolat bakteri endofit memiliki aktivitas kuat terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* dengan kode isolat BTG1, DNX11, BNG1, serta 1 isolat endofit yang memiliki aktivitas sedang dengan diameter zona hambat tertinggi terhadap *Fusarium sp.*

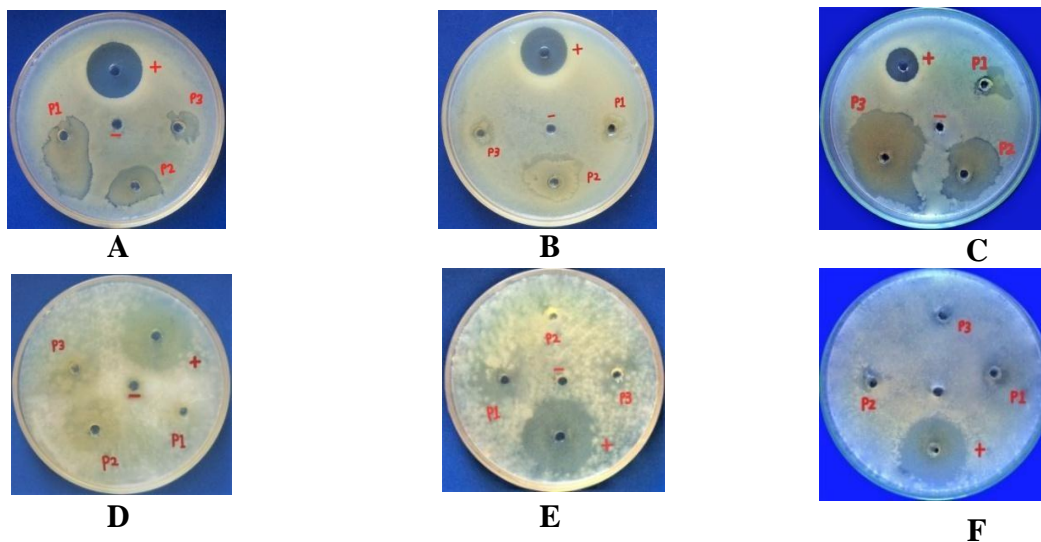
Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa isolat endofit yang diperoleh tidak cukup mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. viridans* dan *K. pneumoniae*. Hal tersebut disebabkan dinding sel bakteri *S. viridans* mengandung asam lipoteikoat, yang berperan untuk membatasi kemampuan autolisis dalam memutus ikatan NAG dan NAM (Baron, 1996). Sehingga senyawa polifenol yang terdapat pada tanaman delima putih sulit untuk merusak integritas ikatan tersebut. Sedangkan bakteri *K. pneumoniae* memiliki kapsul yang terdiri atas polisakarida dan tidak larut dalam gugus alkohol pada senyawa fenol (Paczosa and Joan, 2016). Selain itu kemampuan isolat endofit dari daun menunjukkan penghambatan terhadap bakteri uji daripada jamur uji, begitu pula sebaliknya isolat endofit dari kulit buah menunjukkan penghambatan terhadap jamur uji daripada bakteri uji. Contohnya isolat DNX11 memiliki

aktivitas kuat terhadap bakteri uji namun tidak pada jamur uji. Perbedaan ini akibat efek antimikroba dari senyawa fenol yang terdapat pada daun delima putih. Senyawa tersebut memiliki gugus alkohol (-OH) yang mampu berikatan dengan lipid, penyusun dinding sel bakteri sehingga dinding selnya akan rusak. Sedangkan dinding sel jamur tersusun dari kitin, sebuah senyawa β 1,4-homopolimer dari NAG yang tidak larut dalam alkohol. Hal tersebut menyebabkan senyawa fenol tidak cukup mampu merusak dinding sel jamur yang tersusun oleh kitin (Lenardon *et al.*, 2010). Secara deskriptif, perbedaan rerata zona hambat yang terbentuk dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain sensitivitas mikroorganisme, populasi mikroba uji, medium kultur, dan senyawa aktif yang dihasilkan oleh isolat bakteri endofit dari suatu tanaman (Hidayah *et al.*, 2016). Secara umum senyawa aktif yang paling utama pada tanaman delima putih adalah senyawa polifenol. Senyawa polifenol sendiri merupakan senyawa nonpolar yang berpotensi sebagai antimikroba yang bekerja dengan cara menghambat pertumbuhan bakteri melalui koagulasi dan denaturasi protein serta melisis membran sel bakteri sehingga mampu melawan bakteri gram negatif yang memiliki struktur dinding sel yang lebih kuat (Suman and Prerak, 2019).

Telah disebutkan sebelumnya bahwa ekstrak tanaman delima dari berbagai pelarut menunjukkan aktivitasnya sebagai antimikroba. Dari penelitian ini diperoleh bahwa isolat endofit memiliki daya hambat terhadap mikroba patogen dengan kekuatan kuat, sedang, dan lemah. Sehingga mengindikasikan bahwa bakteri endofit yang terdapat pada tanaman delima putih juga berpotensi sebagai antimikroba dengan catatan belum mengetahui secara pasti perbedaan keduanya. Sebab tidak dilakukan uji efektivitas antara ekstrak dengan bakteri endofit.



Gambar 1 Rerata diameter zona hambat bakteri endofit terhadap bakteri uji: *S. aureus* (▨), *S. viridans* (▩), *S. dysenteriae* (▧), *K. pneumoniae* (▦) dan *Fusarium sp.* (▤)



Gambar 2 Zona hambat uji antimikroba bakteri endofit terhadap *S. dysenteriae* isolat BTG1(A), isolat DNX11 (B), isolat BNG1(C); terhadap *Fusarium* sp. isolat DNX11(D), isolat KLBX12 (E), isolat BNG1(F)

Karakterisasi bakteri Endofit Potensial

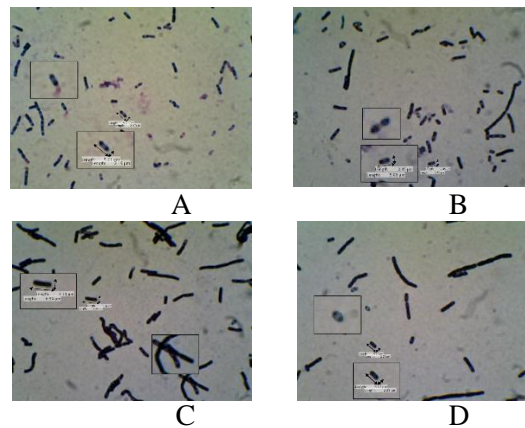
Karakterisasi bakteri dilakukan pada seluruh isolat endofit yang diperoleh, sebab semua isolat endofit menunjukkan potensinya sebagai antimikroba. Hasil karakterisasi dari bakteri endofit potensial menunjukkan bahwa seluruh isolat memiliki koloni yang berwarna putih, bentuknya mulai dari circular

sampai irregular, elevasinya dari raised sampai flat dengan tepian mulai dari undulate, lobate, entire, dan erose. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa seluruh isolat endofit termasuk gram positif, bentuk sel basil, dan memiliki spora. Hasil tes uji biokimia diperoleh 4 isolat yang berbeda berdasarkan sifat fisiologisnya. Hasil pengamatan selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 3.

Tabel 1 Karakterisasi Bakteri Endofit

No.	Sifat isolate	Bakteri endofit						
		BTG1	DNX11	DNX12	DNX2	BNG1	KLBX11	KLBX12
1.	Bentuk	Irregular	Irregular	Circular	Circular	Irregular	Circular	Irregular
2.	Warna	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
3.	Elevasi	Raised	Raised	Raised	Flat	Raised	Raised	Raised
4.	Tepi	Undulate	Lobate	Entire	Entire	Erose	Entire	Lobate
5.	Gram	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif
6.	Bentuk sel	Basil berspora	Basil berspora	Basil berspora	Basil berspora	Basil berspora	Basil berspora	Basil berspora
Uji Biokimia								
7.	TSI	-/B	-/B	-/B	-/B	-/B	-/B	-/B
8.	SC	-	+	+	+	+	+	+
9.	Indole	+	-	-	-	-	-	-
10.	Fruktosa	+	-	-	-	-	+	-
11.	Glukosa	-	-	-	-	-	-	-
12.	Manitol	-	-	-	-	-	-	+
13.	Maltosa	+	+	+	+	+	+	+
14.	Motilitas	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan: Triple Sugar Iron (TSI), Simmon’s citrate (SC), positif (+), negative (-), dan basa (B)



Gambar 3. Pewarnaan Gram pada isolat bakteri endofit potensial (perbesaran 1000x)

Banyaknya persamaan dalam tes biokimia menunjukkan bahwa mereka saling dekat atau dekat secara genus dan adanya perbedaan menunjukkan adanya perbedaan dalam spesies (Zulkifli, 2018).

Kesimpulan

Dari hasil penelitian aktivitas antimikroba tanaman delima putih (*Punica granatum*) didapatkan dua isolat bakteri endofit (DNX2 dan BNG1) memiliki aktivitas kuat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, 3 isolat bakteri endofit (BTG1, DNX11, dan BNG1) memiliki aktivitas kuat terhadap *Shigella dysenteriae*. Sebanyak 1 isolat endofit dengan kode KLBX11 yang memiliki diameter zona hambat sebesar 9.3mm dengan kategori sedang dalam melawan jamur *Fusarium* sp. Seluruh isolat bakteri endofit yang diperoleh merupakan bakteri gram positif, dengan bentuk sel basil, umumnya berspora dan koloni yang berwarna putih. Perlu diperhatikan lagi kesterilan selama bekerja di dalam Laboratorium agar data hasil pengamatan yang diperoleh dapat menggambarkan keadaan yang sebenarnya.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dapat dilaksanakan dengan baik berkat bantuan dari berbagai pihak, oleh sebab itu peneliti mengucapkan terima kasih kepada Dosen Pembimbing 1 dan 2, Pegawai laboratorium dan teman-teman yang telah membantu.

Referensi

Agustina, S., Ruslan, & Agrippina W. (2016). Skrining Fitokimia Tanaman Obat di Kabupaten Bima. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of*

Applied Chemistry). 4 (1):71-76.
<https://ojs.unud.ac.id/index.php/cakra/article/download/21426/14159>

Ariyanti, N. K., Ida B. G. D., & S. Ketut S. (2012). Daya Hambat Ekstrak Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe barbadensis* Miller) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATC 25922. *Jurnal Biologi*. 16 (1): 1-4.
<https://ojs.unud.ac.id/index.php/BIO/article/download/5301/4057>

Baron, S. (1996). *Medical Microbiology*. 4th Edition. Galveston: University of Texas Medical Branch.

Blegur, F. & Antonius Gelong (2016). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Batang Delima (*Punica granatum* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 tahun 2016. *Jurnal info Kesehatan*. 15(2):190-196.
<http://jurnal.poltekeskupang.ac.id/index.php/infokes/article/view/184>

Cappuccino, J. G. & Sherman N. (2014). *Microbiology: A Laboratory Manual 10th Edition*. USA: Pearson.

Compean, K.L. & R.A. Ynalvez. (2014). Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites. *Research Journal of Medicinal Plant*. 8(5):204-213. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2014.204.213>

Entjang, I. (2003). *Mikrobiologi & Parasitologi untuk Akademi Keperawatan dan Sekolah Tenaga Kesehatan yang Sederajat*. Bandung: PT. Citra Aditya Bakti.

- Hidayah, N., Aisyah K. H., Ahmad S., Irawati, & Dewi M. (2016). Uji Efektivitas Ekstrak *Sargassum muticum* sebagai Alternatif Obat Bisul Akibat Aktivitas *Staphylococcus aureus*. *Journal of Primary Education*. 2 (1): 6-9. <https://journal.unnes.ac.id/nju/index.php/jcs/article/view/7794>
- Moghaddam, E. H., Mahmood, E., & Mahdi, S. (2018). An Investigation of The Secondary Metabolites and Antioxidant Capacity of Some Commercial Iranian Pomegranate (*Punica granatum L.*) Cultivars under Drought Stress. *Herbal Medicines Journal*. 3(1):14-25. <https://doi.org/10.22087/hmj.v3i1.704>
- Nurhayati (2011). Penggunaan Jamur dan Bakteri dalam Pengendalian Penyakit Tanaman Secara Hayati yang Ramah Lingkungan. Prosiding Semirata. Sumatera Selatan: Universitas Sriwijaya. <http://repository.unsri.ac.id/9204/>
- Paczosa, M. K. & Joan, M. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80(3):629-650. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
- Rongai, D., Patrizio P., Barbara P., & Filomena M. (2016). Antifungal Activity of Pomegranate Peel Extract Against Fusarium Wilt on Tomato. *European Journal of Plant Pathology*. 145(3):3-12. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0994-7>
- Semangun, H. (2006). *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Strobel G. (2003). *Endophytes as sources of bioactive products*. *Microbes and Infection* (5): 535– 544. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00073-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00073-X)
- Suman, M. & Prerak B. (2019). A Review on Proactive Pomegranate One of The Healthiest Foods. *International Journal of Chemical Studies*. 7(3):189-194. https://www.researchgate.net/publication/332872787_A_review_on_proactive_pomegranate_one_of_the_healthiest_foods
- Suriawiria, U. (2005). *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Paps Sinar Sinanti.
- Zulkifli, L., D. S. Dyah J., & S. Bahri (2018). Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Endofit Kulit Batang Srikaya (*Annona squamosa*) dan Potensinya sebagai Antibakteria. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA (JPPIPA)*. 4(1):21-29. <https://doi.org/10.29303/jppipa.v4i1.98>