



Optimasi *Pepton Water* Sebagai Sumber Karbon Untuk Produksi Senyawa Antibakteri Oleh Bakteri Endofit Tumbuhan Andalas (*Morus Macroura* Miq.) Isolat B.J.T.A.2.1

Miftahul Febrina

Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Padang
Email: Miftahulfebrina@gmail.com

ABSTRAK

Sejak ditemukannya penisilin pertama kali pada tahun 1940, masalah infeksi oleh bakteri Gram positif masih menjadi masalah serius dalam dunia kedokteran. Dibutuhkan senyawa antibakteri baru yang lebih efektif dalam mengobati penyakit infeksi. Isolat B.J.T.A.2.1 merupakan bakteri endofit dari tumbuhan Andalas (*Morus macroura* Miq.) yang diketahui mampu menghasilkan senyawa aktif antibakteri. Senyawa antibakteri diproduksi melalui proses fermentasi. Fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya komposisi medium. Medium dikelompokan menjadi makronutrien dan mikronutrien. Komponen penting pada makronutrien adalah sumber karbon. Tujuan penelitian ini adalah melihat komposisi *pepton water* yang dan sumber karbon terbaik dalam menghasilkan senyawa antibakteri oleh bakteri endofit Andalas isolat B.J.T.A.2.1. Komposisi *pepton water* yang digunakan yaitu 1, $\frac{1}{2}$, dan $\frac{1}{4}$. sedangkan sumber karbon yang digunakan yaitu maltosa, laktosa, sukrosa, glukosa dan amilum. Konsentrasi yang digunakan 0,5% dan 2%.. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi kertas cakram. Hasil penelitian menunjukkan komposisi pepton water yang terbaik dalam menghasilkan senyawa antibakteri bakteri endofit Andalas isolat B.J.T.A.2.1 yaitu komposisi 1. Sedangkan sumber karbon yang terbaik dalam menghasilkan senyawa antibakteri bakteri endofit Andalas isolat B.J.T.A.2.1 adalah maltosa dengan konsentrasi 0,5%. Kesimpulannya terdapat interaksi antara jenis dan konsentrasi sumber karbon dalam memproduksi senyawa antibakteri oleh bakteri endofit Andalas isolat B.J.T.A.2.1.

Kata kunci: optimasi, resistensi, bakteri endofit, *pepton water*, sumber karbon

PENDAHULUAN

Pendahuluan

Sejak ditemukannya penisilin pertama kali pada tahun 1940, masalah infeksi oleh bakteri Gram positif masih menjadi masalah serius dalam dunia kedokteran. Bakteri Gram positif diketahui sebagai penyebab beberapa infeksi penting pada manusia, diantaranya adalah infeksi pada saluran kemih, saluran pencernaan, pneumonia, osteomyelitis, endocarditis dan lain-lain (Kulkarni, *et al.*, 2019).

Berdasarkan laporan *World Health Organization* (WHO) (2014), ditemukan peningkatan kasus resistensi bakteri *Staphylococcus* sp terhadap antibiotik meticilin, yaitu dari jumlah kasus 63% pada tahun 2009 menjadi 80% pada tahun 2013. Meningkatnya kasus resistensi, mendorong para ilmuwan untuk menyelidiki dan menemukan sumber zat baru yang memiliki kemampuan antibakteri yang lebih baik. Salah satu sumber antibakteri baru yang dapat dikembangkan adalah dari bakteri endofit



Andalas (*Morus macroura* Miq). Menurut Soekamto *et al.*, (2005), Andalas memiliki beberapa senyawa alkaloida, saponin dan polifenol. Disamping itu, Andalas juga mengandung fenol seperti *lunularin*, *oksiresveratrol*, *morasin M*, *umbeliferon* dan *B-resolsiladehid*. Senyawa-senyawa ini memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Menurut Sturz and Nowak., (2000) dan Radji, (2005), bakteri endofit mampu memproduksi senyawa metabolit sekunder yang sama dengan tumbuhan inangnya, bahkan dalam jumlah yang relatif tinggi.

Penelitian yang dilakukan oleh Afifah *et al.*, (2018) berhasil mengisolasi bakteri endofit dari batang tumbuhan Andalas. Ada 10 isolat yang mempunyai kemampuan menghasilkan senyawa antibakteri, dimana isolat B.J.T.A.2.1 merupakan salah satu isolat yang baik dalam menghasilkan senyawa antibakteri khususnya terhadap bakteri Gram positif.

Fermentasi dipengaruhi oleh dua faktor, yaitu faktor internal dan eksternal. Faktor internal yang mempengaruhi proses fermentasi antara lain jenis bakteri. Perbedaan jenis bakteri akan mempengaruhi jalur metabolisme dan jenis senyawa aktif yang dihasilkan. Sedangkan faktor eksternal yang mempengaruhinya terdiri dari suhu, ph, konsentrasi starter, waktu fermentasi dan komposisi medium (Hidayati *et al.*, 2017).

Medium merupakan salah satu faktor penting pada proses fermentasi. Variasi komposisi medium secara signifikan dapat mempengaruhi hasil fermentasi. Medium adalah nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan bakteri. Salah satu nya adalah *pepton water*. Pepton dalam media pertumbuhan mikroba berfungsi sebagai sumber nitrogen. Berdasarkan kebutuhannya, secara garis besar, medium dapat dikelompokan menjadi makronutrien dan mikronutrien. komponen penting pada makronutrien adalah sumber Karbon (C) (Hidayat, 2006).

Sumber karbon dapat menentukan kualitas dan kuantitas produk yang terbentuk. Karbon merupakan unsur yang paling penting bagi mikroorganisme, dimana, sekitar 50% berat kering mikroba mengandung unsur karbon. Selain itu, karbon sangat dibutuhkan untuk meningkatkan enegi yang dibutuhkan dalam proses biosintesis (Smith, 1990). Masing-masing bakteri dapat bereaksi berbeda terhadap sumber dan konsentrasi karbon yang digunakan dalam fermentasi. Menurut penelitian Das *et al.* (2016), isolat AM7 menghasilkan antimikroba tertinggi ketika medium fermentasi mengandung sukrosa 2% dibandingkan jenis karbohidrat lainnya. Selanjutnya, penelitian Nand, (2017) menunjukkan bahwa sumber karbon maltosa dengan konsentrasi 2% adalah sumber karbon terbaik dalam memproduksi amylase oleh *Bacillus licheniformis* JAR-26. Penelitian Rozana dkk., (2013), menunjukkan produksi protease oleh *Bacillus* sp terbaik pada medium fermentasi yang mengandung amilum 1,5%. Konsentrasi terbaik sumber karbon 1,5% juga diungkapkan dalam penelitian yang dilakukan oleh Kurniawan (2017), dimana produksi protease termostabil terbaik ketika medium mengandung maltosa 1,5%.





METODE PENELITIAN

Pembuatan Kultur Starter B.J.T.A 2.1

Pembuatan kultur *starter* dilakukan dengan cara memasukkan 2-3 ose isolat B.J.T.A.2.1 ke dalam *erlenmeyer* yang berisi 10 mL medium NB yang sudah disterilkan. Kultur *starter* diinkubasi di *shaker inkubator* pada suhu ruang dengan kecepatan 150 rpm selama 12 jam.

Optimasi *Pepton Water*

Medium *pepton water* dibuat dengan cara bubuk *pepton water* ditimbang sebanyak 39 g dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* 1000 mL, dilarutkan dengan *aquadest* sampai volume 1000mL, dan diaduk hingga homogen. Dituang ke dalam empat *erlenmeyer* berukuran 250 mL. *Erlenmeyer* ditutup dengan kapas dan alumunium foil, selanjutnya disterilisasi dalam *autoclave*.

Pada komposisi 1 dimasukkan 20 mL *pepton water*, komposisi $\frac{1}{2}$ 10 mL *pepton water* dan ditambahkan dengan 10 mL *aquadest* steril, dan komposisi $\frac{1}{4}$ 5 mL *pepton water* dan ditambahkan 15 mL *aquadest* steril . Masing- masing perlakuan menggunakan *erlenmeyer* berukuran 100 mL.. *Starter* bakteri endofit isolat BJ.T.A.2.1 yang telah ditumbuhkan pada medium NB diencerkan dengan NaCl 0,9 %, sampai kekeruhannya setara dengan *Mcfarland's* 1. Kekeruhan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm dengan OD 0,14 - 0,18 (setara dengan 3×10^8 CFU/mL). Inokulum dimasukkan 200 μ L ke dalam 20 mL masing-masing medium *pepton water* . Selanjutnya dimasukkan 5 mL pada tabung reaksi. Setiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan. Kultur diinkubasi di *shaker incubator* (kecepatan 150 rpm) pada suhu ruang selama 24 jam. Sebanyak 1000 μ L cuplikan hasil fermentasi diambil, dan dimasukkan ke dalam tabung 1,5 mL. Hasil fermentasi disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit untuk memisahkan supernatan dari massa selnya. Supernatan kemudian disimpan pada suhu 4°C selanjutnya digunakan untuk uji aktifitas antibakteri.

Optimasi Sumber Karbon

Starter bakteri endofit isolat B.J.T.A.2.1 yang telah ditumbuhkan pada medium NB diencerkan dengan NaCl 0,9 %, sampai kekeruhannya setara dengan *Mcfarland's* 1. Kekeruhan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm dengan OD 0,14 - 0,18 (setara dengan 3×10^8 CFU/mL). Inokulum dimasukkan 200 μ L ke dalam 20 mL masing-masing medium fermentasi yang mengandung komposisi *pepton water* 1 dan dikombinasikan dengan sumber karbon. Setiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan. Kultur diinkubasi di *shaker incubator* (kecepatan 150 rpm) pada suhu ruang



selama 24 jam. Sebanyak 1000 μL cuplikan hasil fermentasi diambil, dan dimasukkan ke dalam microtube. Hasil fermentasi disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit untuk memisahkan supernatan dari massa selnya. Supernatan kemudian disimpan pada suhu 4°C selanjutnya digunakan untuk uji aktifitas antibakteri.

Uji Aktifitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi kertas cakram. Bakteri uji yang kekeruhannya sudah disetarkan dengan *McFarland's* 0,5 diinokulasikan dengan rata ke medium NA menggunakan *cotton bud* steril. Masing-masing produk fermentasi, yang akan diuji, diteteskan sebanyak 20 μL pada kertas cakram steril dan dibiarkan sampai jenuh. Selanjutnya, kertas cakram diletakkan di atas medium NA yang sebelumnya sudah diinokulasi dengan bakteri uji. Cawan petri diinkubasi pada suhu ruang dengan kondisi cawan petri dibalikkan selama 24 jam.

Zona hambat yang terbentuk, diukur menggunakan jangka sorong pada bagian bawah cawan petri. Cawan petri diletakkan di atas permukaan yang berwarna gelap dan diberi pantulan cahaya. Diameter zona hambat yang terbentuk pada setiap sekitaran bakteri endofit diukur dari beberapa sisi yang berbeda kemudian dirata-ratakan. Cara mengukur zona hambat dapat dilihat pada Gambar 1



Gambar 1. Pengukuran Diameter Zona Hambat (Hester *et al.*, 2014)

Diameter zona hambat ditentukan dengan rumus :

$$\text{Diameter zona hambat (d)} = \frac{d_1 + d_2 + d_3 + \dots}{d_n}$$

d = Diameter zona hambat

d_1 = Diameter zona bening 1

d_2 = Diameter zona bening 2

d_3 = Diameter zona bening 3

d_n = Jumlah pengukuran

Desain Penelitian

Proses optimasi *Pepton Water* dan sumber karbon medium fermentasi bakteri endofit tumbuhan Andalas isolat B.J.T.A.2.1 dalam memproduksi senyawa antibakteri



dilakukan secara terpisah. Optimasi *pepton water* menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Kombinasi perlakuan pada *pepton water* dapat dilihat pada tabel 1.

No	Medium	Komposisi								
		1			½			¼		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1.	<i>Pepton Water</i>	P(1)	P(2)	P(3)	P(1)	P(2)	P(3)	P(1)	P(2)	P(3)

Proses optimasi sumber karbon menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial, masing-masing dengan tiga ulangan. Untuk proses optimasi sumber karbon, percobaan yang dilakukan terdiri dari faktor pertama berupa jenis sumber karbon (5 taraf perlakuan) dan faktor kedua berupa konsentrasi sumber karbon (2 taraf perlakuan). Kombinasi perlakuan pada proses optimasi sumber karbon dapat dilihat pada Tabel 2.

No	Jenis Karbon	Konsentrasi (%)					
		0,5%			2%		
		1	2	3	1	2	3
1.	Maltosa	M(1)	M(2)	M(3)	M(1)	M(2)	M(3)
2.	Laktosa	L(1)	L(2)	L(3)	L(1)	L(2)	L(3)
3.	Sukrosa	S(1)	S(2)	S(3)	S(1)	S(2)	S(3)
4.	Glukosa	G(1)	G(2)	G(3)	G(1)	G(2)	G(3)
5.	Amilum	A(1)	A(2)	A(3)	A(1)	A(2)	A(3)

Analisis Data

Data diameter zona hambat hasil optimasi *pepton water* dan sumber karbon medium fermentasi diolah secara statistik dengan menggunakan uji ANOVA. Apabila terdapat perbedaan yang signifikan, akan dilanjutkan dengan uji lanjut BNJ taraf 5%. Data hasil analisis statistik ditampilkan dalam bentuk tabel.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pepton water merupakan sumber nitrogen yang dibutuhkan oleh mikroorganisme sebagai nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Nitrogen berperan dalam pertumbuhan sel dan umumnya diperlukan dalam jumlah yang relatif



besar. Nitrogen merupakan bagian penting dari protein, enzim, nukleotida dan kofaktor yang berperan dalam metabolisme bakteri. Komposisi *pepton water* terdiri dari pepton, tryptophan, dan NaCl. Komposisi *pepton water* tidak berpengaruh nyata terhadap senyawa antibakteri bakteri endofit isolat B.J.T.A.2.1 yang dapat dilihat pada tabel 3.



Tabel 3. Data Diameter Zona Hambat Optimasi *Pepton Water* oleh Bakteri Endofit Tumbuhan Andalas Isolat B.J.T.A.2.1 Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

No	Komposisi	Ulangan (cm)			Rata-rata
		1	2	3	
1	1	1,66	1,26	2,02	1,64 ^a
2	½	0,90	1,37	1,74	1,33 ^a
3	¼	1,12	1,11	1,19	1,14 ^a

Keterangan : Angka yang diikuti dengan notasi yang sama menunjukkan perlakuan yang tidak berbeda nyata (taraf 5%). Pemberian notasi diurutkan dari yang paling tinggi, yaitu notasi “a”.

Berdasarkan data pada tabel 3 rata-rata Diameter zona hambat terbesar dihasilkan pada komposisi 1 *pepton water* dan rata-rata diameter zona hambat terkecil pada komposisi ¼. Hal ini menunjukkan bahwa semakin rendah komposisi *pepton water* maka zona hambat yang dihasilkan juga semakin kecil. Dikarenakan hasil uji aktifitas *pepton water* yang terbaik pada komposisi 1, maka komposisi tersebut digunakan sebagai medium fermentasi untuk optimasi sumber karbon dalam menghasilkan senyawa antibakteri dari isolat B.J.T.A.2.1. Sumber karbon yang digunakan terdiri dari maltosa, laktosa, sukrosa, glukosa, dan amilum. Uji aktifitas senyawa antibakteri oleh bakteri endofit Andalas isolat B.J.T.A.2.1 terhadap bakteri Gram positif dilakukan dengan metode difusi cakram. Hasil analisis statistik sumber karbon menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata (taraf 5%) dalam produksi senyawa antibakteri oleh bakteri endofit Andalas isolat B.J.T.A.2.1 yang dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Data Diameter Zona Hambat Optimasi Sumber Karbon Oleh Bakteri Endofit Tumbuhan Andalas Isolat B.J.T.A.2.1 Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Sumber Karbon (A)	Rata-rata Diameter Zona Hambat (cm)		Rata-Rata Utama A
	Konsentrasi (B)		
	0,5%	2%	
Maltosa	1,99 ^a	1,53 ^a	1,76 ^A
Laktosa	1,57 ^a	1,50 ^a	1,53 ^{AB}
Sukrosa	1,68 ^a	1,59 ^a	1,63 ^{AB}
Glukosa	1,86 ^a	1,45 ^a	1,65 ^{AB}
Amilum	1,72 ^a	0,92 ^b	1,19 ^B
Rata-Rata	1,76 ^A	1,40 ^B	



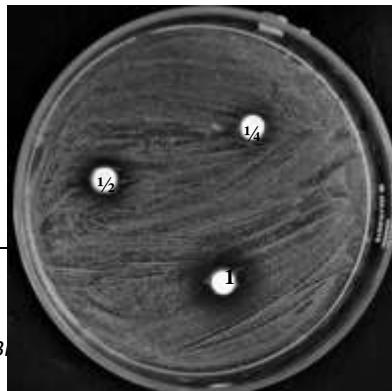
Utama B			
---------	--	--	--

Keterangan : Angka yang diikuti dengan notasi yang sama menunjukkan perlakuan yang tidak berbeda nyata (BNJ taraf 5%). Pemberian notasi diurutkan dari yang paling tinggi, yaitu notasi "a". Notasi huruf besar menyatakan pengaruh utama. Notasi huruf kecil menyatakan interaksi.

Berdasarkan data pada tabel 4 dapat dilihat bahwa perlakuan jenis sumber karbon memberikan pengaruh yang nyata (taraf 5%) terhadap kemampuan bakteri endofit Andalas isolat B.J.T.A.2.1 dalam memproduksi senyawa antibakteri. Jenis sumber karbon yang terbaik dalam menghasilkan senyawa antibakteri adalah maltosa. Pada perlakuan konsentrasi sumber karbon juga terdapat pengaruh yang nyata dalam menghasilkan senyawa antibakteri. Konsentrasi yang terbaik dalam menghasilkan senyawa antibakteri yaitu 0,5%. Berdasarkan hasil uji statistika terdapat interaksi antara jenis dan konsentrasi sumber karbon dalam menghasilkan senyawa antibakteri.. Dimana perlakuan interaksi terbaik yaitu maltosa dengan konsentrasi 0,5%. Sedangkan perlakuan yang terendah yaitu amilum dengan konsentrasi 2%. Berdasarkan tabel 4 dapat dilihat bahwa semakin besar konsentrasi sumber karbon maka diameter zona hambat yang dihasilkan semakin kecil. Menurut Agustien A, (1988) karbohidrat yang terdapat dalam medium menyebabkan peningkatan pertumbuhan mikroorganisme, tetapi dapat memberikan efek negatif jika berada dalam jumlah yang banyak. Sumber karbon dengan konsentrasi yang tinggi dalam medium berperan sebagai reseptor katabolit sehingga menurunkan produksi aktifitasnya.

Karbon merupakan nutrisi terpenting dari semua biomolekul (protein, lipid, karbohidrat, dan asam nukleat) serta dibutuhkan dalam jumlah besar pada medium fermentasi. Menurut Trismilah dan Sumaryanto (2005) unsur karbon dapat meningkatkan energi dan biosintesis sehingga persediaan sumber karbon yang cukup diperlukan untuk fermentasi. Setiap bakteri memerlukan jumlah dan jenis sumber karbon yang berbeda. Faktor yang mempengaruhi penggunaan jenis karbon pada bakteri diantaranya adalah jenis bakteri dan jenis produk metabolit yang dihasilkan.

Tabel 5. Hasil uji aktifitas antibakteri optimasi pepton water dan sumber karbon terhadap *Staphylococcus aureus*

Optimasi pepton water	Optimasi sumber karbon
	



--	--

Keterangan: 1 = Komposisi 1
½ = Komposisi ½
¼ = Komposisi ¼

Keterangan: M (Maltosa)
L (Laktosa)
S (Sukrosa)
G (Glukosa)
A (Amilum)

PENUTUP

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa komposisi *pepton water* yang terbaik yaitu komposisi 1, sedangkan sumber karbon yang terbaik untuk menghasilkan senyawa antibakteri yaitu maltosa dengan konsentrasi 0,5%..

REFERENSI

Afifah, N. (2018). *Isolasi Bakteri Endofit dari Batang Tumbuhan Andalas (Morus macroura Miq.) dan Uji Potensinya sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba*. Padang: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. (Skripsi)

Agustien, A. 2010. Isolasi, Optimasi dan Amobilisasi *Brevibacillus agri* A-03 dari Sumber Air Panas Sumatera Barat Penghasil Protease Alkali dan Keratinase Termostabil Serta Aplikasinya. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran Bandung. (Disertasi)

Das, M. P., Bhowmick, M., Reynolds, M. (2016). Optimization of Culture Conditions for Production of Antibacterial Metabolite by Marine Bacteria *Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 38(2), 5. (Jurnal)

Hidayat, M. C. (2006). *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Andi Offset.Hidayati, Masdiana, dan Sri Suhartini. (2017). *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Penerbit Andi. (Buku)

Kulkarni Atul ,P. V. C. (2019). Current Perspectives On Treatment of Gram Positif Infection in India: What Is the Way Forward? *Interdisciplinary Perspectives on Infections Diseases*, 8. (Buku)

Kurniawan, H. M. (2017). Isolasi dan Optimasi Ekstrinsik Bakteri Termo-Proteolitik Isolat Sumber Air Panas Semurup, Kab. Kerinci, Jambi. *Scientia Journal*, 62-67. (Jurnal)

Nand Lal, J. J. (2017). Optimization of Carbon Sources for the Amylase Production and Growth. *Indian Journal of Biology*, 31-35. (Jurnal)



Radji, M. (2005). Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Makalah Ilmu Kefarmasian*, 2(3), 360-368. (Makalah)

Rozana, Z., Anthoni, A., dan Yetria, R. (2013). Pengaruh Konsentrasi Sumber Karbon dan Nitrogen Terhadap Produksi Protease Alkali dari *Bacillus* Sp. M1.2.3 Termofilik. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*. 273-276. (Prosiding)

Smith, J. E. (1990). *Prinsip Bioteknologi*. Jakarta: Gramdium. (Buku)

Soekamto, N. H., Achmad, S. A., Ghisalberti, E. L., Hakim, E. H., Syah, Y. M. (2005). Lunularin and Oxyresveratrol: Two Stilben Derivates from *Morus macroura*. *Indonesian Journal of Chemistry*, 5(3), 207-210. (Jurnal)

Sturz, A., Nowak J. (2000). Endophytic Communities of Rhizobacteria and the Strategies Required to Create Yield Enhancing Associations with Crops. *Applied Soil Ecology*, 15, 8.

Trismilah, S dan Sumaryanto. 2005. Pengaruh Kadar Nitrogen dalam Media pada Pembuatan Protease Menggunakan *Bacillus mengaterium* DSM 319. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 3(1) : 9-12. (Jurnal)

World Health Organization. 2014. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. (Riset)