



Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bakteri Endofit dan Identifikasi Bakteri yang Diisolasi dari Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle)

(Antibacterial activities screening of endophytic bacterial extracts and identification bacteria isolated from lime peel (*Citrus aurantifolia* Swingle))

Rustini*, Friardi Ismed, & Gina Sasha Nabila

Fakultas Farmasi Universitas Andalas, Limau Manis, Kecamatan Pauh, Kota Padang, Sumatera Barat

ABSTRACT: Lime peel (*Citrus aurantifolia* Swingle) is a plant part widely used for treatment with various pharmacological activities. However, little is known about the study of endophytic bacteria associated with the peel of this plant. This study aimed to isolate endophytic bacteria from lime peel and evaluation its activity in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteria. Six bacterial isolates were isolated and fermented in Nutrient Broth (NB) media. The results of the fermentation were extracted using ethyl acetate as a solvent. The crude extract of each isolate was evaluated for its antibacterial activity using the Kirby-Bauer diffusion method. According to the inhibition zone measurements, it was shown that the extracts from isolate 3 and isolate 5 had a strong inhibitory diameter of >10 mm. Qualitative identification showed that the extract from isolate 3 showed positive results for alkaloids and flavonoids, while isolate 5 was positive for alkaloids, flavonoids, and polyphenols. These isolates were then identified, and it was reported that isolate 3 was *Bacillus velezensis* JS25R, and isolate 5 was *Staphylococcus* sp. This extract has been proven to have the potential as antibacterial and to be further isolated and developed by its activity.

Keywords: endophytic bacterial; lime peel (*Citrus aurantifolia* Swingle); antibacterial.

ABSTRAK: Kulit Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) merupakan bagian tanaman yang banyak digunakan untuk pengobatan dengan berbagai aktivitas farmakologis. Namun masih sedikit diketahui kajian tentang bakteri endofit yang terkait dengan kulit buah tanaman ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri endofit dari kulit buah tanaman ini serta menguji aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Sebanyak enam Isolat bakteri berhasil diisolasi lalu difermentasi dalam media *Nutrient Broth* (NB). Hasil fermentasi kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat. Ekstrak kental masing-masing isolat ditentukan aktivitas antibakterinya menggunakan metode difusi *Kirby-Bauer*. Berdasarkan hasil pengukuran zona hambat menunjukkan bahwa ekstrak dari isolat 3 dan isolat 5 memiliki diameter hambat kuat >10 mm. Hasil identifikasi fitokimia secara kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak dari isolat 3 menunjukkan adanya kandungan alkaloid dan flavonoid sedangkan isolat 5 teridentifikasi senyawa alkaloid, flavonoid dan polifenol. Hasil identifikasi penamaan bakteri endofit menunjukkan bahwa isolat 3 merupakan *Bacillus velezensis* strain JS25R dan isolat 5 merupakan *Staphylococcus* sp. Ekstrak dari bakteri endofit ini terbukti memiliki aktivitas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan potensial untuk dilakukan isolasi dan pengembangan terhadap senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas tersebut.

Kata kunci: bakteri endofit; kulit buah jeruk nipis (*C. aurantifolia* Swingle); antibakteri.

Pendahuluan

Penyakit infeksi merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas di dunia. World Health Organization (WHO) mencatat dari 50 juta kematian orang di seluruh dunia pada tahun 2016, lebih dari 5,7 juta kematian disebabkan oleh penyakit infeksi. Untuk pengobatan penyakit infeksi ini digunakan antibiotik. Penggunaan antibiotik yang relatif tinggi menimbulkan berbagai permasalahan di seluruh dunia yaitu resistensi antibiotik [1,2].

Salah satu usaha untuk mengatasi masalah resistensi adalah dengan pencarian antibiotik baru yang berasal dari bahan alam dengan memanfaatkan keanekaragaman tumbuhan yang ada di Indonesia. Salah satu tanaman yang sudah digunakan dalam pengobatan adalah jeruk nipis. Masyarakat biasanya memanfaatkan buah jeruk nipis sedangkan kulitnya masih kurang dimanfaatkan. Kulit jeruk nipis sering dikategorikan sebagai

Article history

Received: 12 April 2022

Accepted: 25 Mei 2022

Published: 27 Juli 2022

Access this article



*Corresponding Author: Rustini

Fakultas Farmasi Universitas Andalas Limau Manis, Kecamatan. Pauh, Kota Padang, Sumatera Barat 25175 | Email: rustini@phar.unand.ac.id

bagian yang tidak dimakan dan dibuang sebagai sampah. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa buah jeruk nipis memiliki efek antibakteri, selain buah kulitnya juga mengandung senyawa antibakteri seperti alkaloid, flavonoid, tanin, kumarin dan minyak atsiri [3]. Dalam penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa kandungan kimia metabolit sekunder yang terkandung di dalam kulit jeruk nipis adalah golongan alkaloid, flavonoid dan golongan polifenol [4,5]. Senyawa kimia ini memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

Selain dari bagian tanaman yang dimanfaatkan sebagai bahan obat, metabolit sekunder bakteri endofit yang hidup di dalam jaringan, kulit, akar, daun, batang dan dilaporkan juga memiliki aktivitas antara lain sebagai antibakteri [6]. Bakteri endofit dapat menghasilkan metabolit sekunder yang menyerupai metabolit sekunder inangnya karena adanya transfer genetik dari tanaman inang ke bakteri endofit. Oleh karena adanya kemampuan bakteri endofit untuk menghasilkan metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar untuk mengisolasi metabolit sekunder dengan hanya mengisolasi bakteri endofit tanaman inangnya [6].

Studi terkait isolasi bakteri endofit dari kulit jeruk nipis (*C. aurantifolia* Swingle) ini adalah yang pertama dilakukan. Sebelumnya banyak terkait dengan jamur endofitik atau organ lain dari tanaman jeruk seperti daun, kulit batang dan akar. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi bakteri endofit dari kulit jeruk nipis, dan menguji aktivitas antibakteri ekstrak dari bakteri yang diisolasi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

Metode Penelitian

Sampel dan Bahan

Kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) dikoleksi di Kebun Tanaman Obat (KTO) Universitas Andalas. Sampel dimasukkan kedalam kantong plastik dan dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Andalas, kemudian diidentifikasi di Herbarium Universitas Andalas Padang (ANDA). Bahan-bahan yang digunakan antara lain media *Nutrient Agar* (Merck®), *Nutrient Broth* (Oxoid®), *Mueller Hinton Agar* (Oxoid®), *aquadest*, NaCl fisiologis 0,9% (Otsuka®), alkohol 70%, plat KLT (Merck), etil asetat, dan kloramfenikol *disc* (Sensi-disc®).

Isolasi Bakteri Endofit

Sampel kulit jeruk nipis (*C. aurantifolia*) dicuci bersih menggunakan air mengalir, lalu dikeringkan. Selanjutnya

disterilisasi permukaan menggunakan natrium hipoklorit selama 2 menit, alkohol 70% selama 2 menit, dan dibilas menggunakan air steril sebanyak 3 kali. Sampel dikeringkan menggunakan tisu steril. Untuk memastikan sterilisasi permukaan berhasil, air bilasan terakhir diinokulasi pada media *Nutrient Agar* (NA), lalu diinkubasi pada suhu 37°C di inkubator selama 2 hari.

Setelah dilakukan sterilisasi permukaan, sampel dipotong dengan ukuran 1-2 cm menggunakan pisau steril. Potongan sampel diletakkan di cawan Petri yang sudah berisi media NA. Kemudian diinkubasi selama 24-48 jam. Koloni yang tumbuh dengan bentuk berbeda dengan koloni lainnya dianggap sebagai isolat berbeda. Koloni bakteri dimurnikan sampai diperoleh isolat murni pada media NA yang baru [7].

Pemurnian Isolat Bakteri Endofit

Bakteri yang tumbuh dimurnikan satu per satu dengan cara memindahkan isolat bakteri yang berbeda dari media NA lama ke media NA baru dalam cawan Petri. Jika masih ada koloni yang berbeda secara makroskopis pada media maka harus dilakukan pemisahan kembali untuk mendapatkan isolat murni.

Pembuatan Suspensi dan Inokulum Isolat Bakteri Endofit

Sebanyak 4 ose isolat bakteri endofit dimasukkan ke dalam 20 mL larutan NaCl fisiologis 0,9% steril, selanjutnya dihomogenkan menggunakan vortex dan dibandingkan kekeruhannya dengan Mc Farland 0,5 [8]. Suspensi isolat bakteri endofit dipindahkan sebanyak 20 mL ke dalam Erlenmeyer, lalu ditambahkan media *Nutrient Broth* (NB) hingga 200 mL. Selanjutnya di *shaker* menggunakan *rotary shaker* pada suhu 30°C dengan kecepatan 200 rpm selama 24 jam [9].

Fermentasi Isolat Bakteri Endofit

Fermentasi dilakukan menggunakan bakteri NB, selama proses fermentasi terjadi pertumbuhan bakteri endofit dan menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Proses fermentasi dilakukan menggunakan 20 mL inokulum bakteri yang telah di *shaker*. Inokulum dimasukkan ke dalam 400 mL media NB untuk masing-masing isolat. Fermentasi dilakukan pada suhu 37°C selama 54 jam dengan pencuplikan pada waktu 30, 36, 42, 48 dan 54 jam, dilakukan pada Erlenmeyer yang berbeda dengan kecepatan 200 rpm menggunakan alat *incubator shaker* [10].

Pemisahan Biomassa dan Supernatan

Pemisahan biomassa dan supernatan dilakukan dengan proses sentrifugasi. Media yang telah difermentasi disentrifus dengan menggunakan alat sentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Endapan yang terbentuk merupakan biomassa sel bakteri, dipisahkan dengan substrat dengan cara pemipetan, kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat [10].

Ekstraksi Metabolit Sekunder dari Isolat Bakteri Endofit

Substrat sebanyak 300 mL di dalam Erlenmeyer, ditambah dengan pelarut etil asetat perbandingan 1:1 v/v. Kemudian dimaserasi selama 24 jam. Lalu larutan dipindahkan ke dalam corong pisah untuk memisahkan ekstrak etil asetat. Dikocok dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan bawah (media) dimaserasi lagi menggunakan pelarut etil asetat 1:1 v/v selama 1 hari dan lapisan atas (ekstrak etil asetat) yang telah dipisahkan, diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak kental etil asetat ditambahkan dengan metanol sebanyak 5 mL dan disimpan pada suhu 4°C.

Uji Aktivitas Antibakteri

Mikroba uji yang digunakan adalah bakteri patogen *S. aureus* ATCC 25923, *E. Coli* ATCC 8739, dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300. Pengujian dilakukan dengan metode difusi cakram *Kirby-Bauer*. 200 µl suspensi bakteri yang telah disetarakan dengan standar 0,5 Mc Farland dimasukkan ke dalam 30 mL media *Mueller Hinton Agar* (MHA) steril, divortex, setelah itu dituang ke dalam cawan Petri, dibiarkan memadat. Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap ekstrak metabolit sekunder bakteri endofit. Konsentrasi ekstrak 10% dengan pelarut DMSO. Cakram ditetesi 10 µl ekstrak. Setelah itu cakram diletakkan di permukaan MHA yang telah memadat. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sebagai kontrol positif kloramfenikol 30µg/disk sedangkan kontrol negatif pelarut DMSO. Setelah inkubasi diukur zona bening disekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong.

Identifikasi Bakteri Endofit

Identifikasi isolat 5 dilakukan dengan pewarnaan Gram dan uji biokimia (uji katalase, Voges-Proskauer dan fermentasi karbohidrat. Uji ini dilakukan di laboratorium Veteriner Baso Bukittingi

Identifikasi isolat 3 dilakukan secara molekuler di Laboratorium Bioteknologi Lingkungan PT Biodiversitas Bioteknologi Lingkungan Indonesia. Langkah pengerjaannya diawali dengan isolasi DNA menggunakan

Kit isolasi DNA, DNA dianalisis menggunakan 16 rRNA. Sekuen basa DNA yang diperoleh diamplifikasi dengan PCR dan di-*sequencing*, kemudian dilakukan analisa berdasarkan hasil BLAST pada database NCBI.

Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Profil KLT dilakukan untuk menunjukkan bercak dan penentuan nilai Rf dari ekstrak isolat yang memiliki aktivitas antibakteri menggunakan fase gerak etil asetat : metanol (9:1). Sebagai penampak bercak digunakan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Bercak yang terlihat dibawah UV diukur nilai Rf-nya.

Pemeriksaan Metabolit Sekunder

Uji Alkaloid

Uji alkaloid dengan metode *Culvenor-Fitzgerald* yaitu dengan sampel dicampur dengan 5 ml kloroform dan 5 ml amoniak kemudian dikocok, dan dipisahkan. Ditambahkan 5 tetes asam sulfat 2N pada masing-masing larutan, dan didiamkan, kemudian masing masing larutan ditambahkan dengan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorf. Terbentuknya endapan jingga, cokelat, dan putih menunjukkan adanya alkaloid [11].

Uji Flavonoid

Uji flavonoid dengan metode Shinoda Test yaitu dengan cara sebanyak 2 mL ekstrak dilarutkan dalam 2 mL etanol dipanaskan. Kemudian ditambahkan sedikit serbuk magnesium dan 10 HCl pekat. Bila terbentuk larutan berwarna merah jingga sampai merah ungu menandakan adanya senyawa flavonoid [12].

Uji Polifenol

Sebanyak 1 mL ekstrak direaksikan dengan beberapa tetes larutan Fe (III) klorida 10%. Bila terbentuk warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menandakan adanya senyawa polifenol [13].

Uji Saponin

Sebanyak 2 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas lalu didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik lalu ditambahkan 1 tetes HCL 2N. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit [14].

Uji Steroid dan Terpenoid

Uji steroid dan terpenoid dengan metode Simes Test yaitu ekstrak ditambahkan 5 mL kloroform dan 5 mL air, kemudian dikocok, didiamkan beberapa menit sampai

terbentuk lapisan. Lapisan kloroform dilewatkan pada arang aktif dan digunakan untuk pemeriksaan terpenoid dan steroid dengan menambahkan asetat anhidrat dan asam sulfat pekat. Warna merah menandakan adanya terpenoid, warna biru menandakan adanya steroid [15].

Hasil dan Diskusi

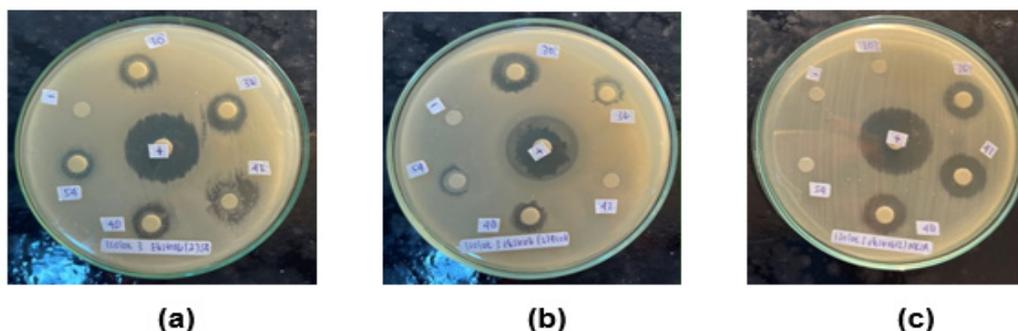
Bakteri endofit yang berhasil diisolasi dan dimurnikan dari kulit jeruk nipis (*C. aurantifolia* Swingle) sebanyak enam isolat. Bakteri endofit ini mulai menunjukkan pertumbuhan setelah potongan bagian tanaman diinokulasi pada media NA selama 48 jam. Pernyataan ini didukung oleh Zinniel,

dkk (2002), Simarmata (2007), Arunachalam dan Gayathri (2010) serta Jalgaonwala, dkk (2010) yang menyatakan bahwa waktu inkubasi yang dibutuhkan yaitu minimal 2 hari. Untuk memastikan bahwa bakteri yang tumbuh merupakan bakteri endofit, bukan bakteri kontaminan yang pada penelitian ini dibuktikan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada cawan Petri yang berisi media NA dan air bilasan terakhir proses sterilisasi. [16].

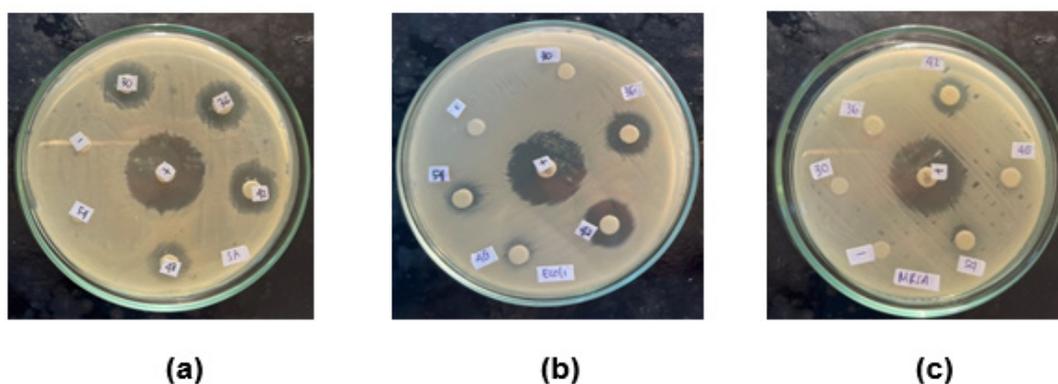
Isolat bakteri endofit yang tumbuh setelah diinkubasi ± 2 hari terus dilakukan pemurnian dengan memisahkan koloni yang berbeda dan menginokulasikan ke media NA baru sehingga diperoleh isolat murni, dan diperoleh enam isolat murni dengan warna dan permukaan yang berbeda-

Tabel 1. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak isolat 3 dan isolat 5 pada konsentrasi 10% DMSO

Sampel	Bakteri Uji	Waktu Pengkulturan	Rata-rata Diameter Hambat (mm) \pm Standar Deviasi (STD)
Ekstrak Isolat 3	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	30	13,90 \pm 0,57
		36	11,55 \pm 5,87
		42	11,92 \pm 5,93
		48	13,70 \pm
		54	9,48 \pm 0,30
	<i>Escherichia Coli</i> ATCC 8739	30	15,80 \pm 0,42
		36	11,05 \pm 3,75
		42	6,65 \pm 9,4
		48	9,94 \pm 1,36
		54	7,30 \pm
	<i>Methycillin Resistant Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300	30	- \pm
		36	13,20 \pm
		42	9,90 \pm 4,24
		48	9,90 \pm 3,96
		54	- \pm
Ekstrak Isolat 5	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	30	13,35 \pm 2,47
		36	13,60 \pm 3,82
		42	11,70 \pm 3,68
		48	13,20 \pm
		54	- \pm
	<i>Escherichia Coli</i> ATCC 8739	30	- \pm
		36	8,90 \pm 0,57
		42	13,42 \pm 2,71
		48	9,0 \pm 3,11
		54	7,25 \pm 0,21
	<i>Methycillin Resistant Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300	30	- \pm
		36	7,22 \pm
		42	\pm
		48	- \pm
		54	- \pm



Gambar 1. Diameter Hambat Bakteri Endofit Isolat 3 Terhadap Bakteri Patogen *S. aureus* (a), *E. coli* (b), MRSA (c)



Gambar 2. Diameter Hambat Bakteri Endofit Isolat 5 Terhadap Bateria Patogen *S. aureus* (a), *E. coli* (b), MRSA (c)

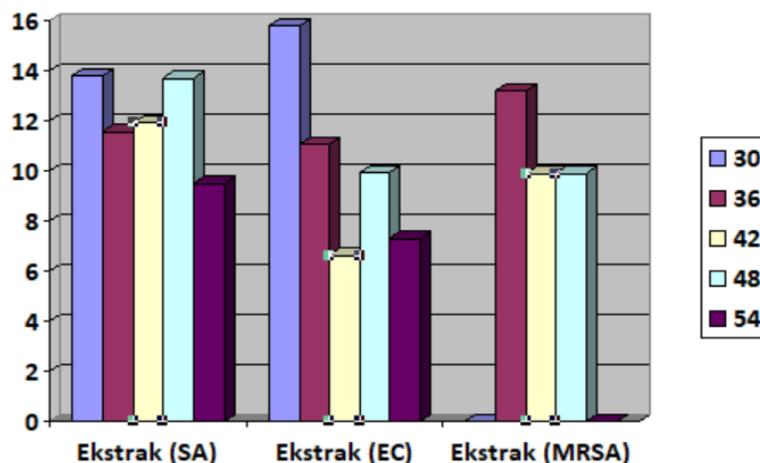
beda. Koloni bakteri isolat 1 berwarna putih susu dengan permukaan merata, isolat 2 warna koloni putih kekuningan dengan permukaan merata, isolat 3 berwarna kuning pucat dengan permukaan tidak merata, isolat 4 berwarna putih kekuningan dengan permukaan bergerigi, isolat 5 warna kuning pucat dan permukaan tebal dan halus sedangkan isolat 6 warna jingga kekuningan dengan permukaan kasar dan tidak merata. Hal ini sesuai dengan Bhore dan Sathisha (2010) yang menyatakan bahwa bakteri endofit pada satu tanaman inang umumnya terdiri atas beberapa genus dan spesies. Keragaman bakteri endofit dalam suatu tanaman juga dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan tanaman, khususnya kondisi tanah. Pada beberapa kasus, tanaman dengan jenis atau spesies yang sama memiliki bakteri endofit yang tidak selalu sama. Pada beberapa tanaman terdapat bakteri endofit yang spesifik dan khas pada tanaman tersebut [17].

Fermentasi dilakukan dengan kecepatan 200 rpm dalam media NB dengan waktu pengkulturan pada jam ke 30, 36, 42, 48 dan 54 menggunakan alat *incubator shaker*. Pencuplikan dilakukan karena bakteri endofit yang diisolasi tidak diketahui jenisnya dan waktu fase stasionernya. Penelitian oleh Djenar *et al* menunjukkan fase stasioner

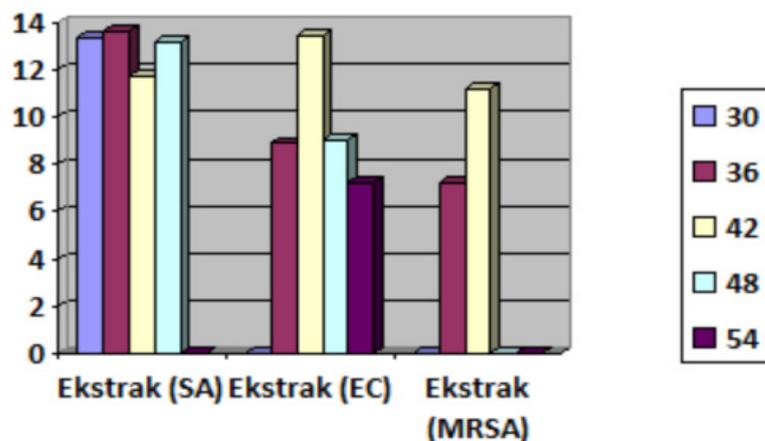
bakteri *Xanthomonas Campestris* berakhir pada jam ke-60. Jumlah metabolit sekunder terbanyak pada awal fase stationer atau akhir dari fase eksponensial.

Menurut Madigan (2013), proses pengadukan dalam media fermentasi diperlukan karena permukaan pada media akan membentuk lapisan tipis jika tidak diaduk dan mengakibatkan produksi metabolit sekundernya juga tidak maksimal. Pengadukan akan menyebabkan medium terus bergerak sehingga terjadi aerasi yang dapat mempertahankan pertumbuhan metabolit sekunder dengan adanya oksigen. *Shaker* akan menyebabkan oksigen terdistribusi merata di dalam media, oksigen ini diperlukan untuk tumbuh dan menghasilkan metabolit sekunder secara optimal, karena media banyak mengandung zat organik dan anorganik yang menyebabkan tingkat oksigen terlarut rendah [18].

Setelah proses fermentasi dilakukan pemisahan antara media dan sel bakteri menggunakan *sentifuse* kecepatan 5000 rpm selama 15 menit agar terjadi pemisahan antara substrat dengan biomassa sel. Endapan sel bakteri dikeringkan menggunakan oven untuk menghitung massa sel bakteri yang terbentuk selama fermentasi. Sedangkan media yang berisi metabolit sekunder dilanjutkan dengan



Gambar 3. Diagram Perbandingan Aktivitas Ekstrak Isolat 3 Berdasarkan Waktu Pengkulturan Terhadap Bakteri Uji



Gambar 4. Diagram Perbandingan Aktivitas Ekstrak Isolat 5 Berdasarkan Waktu Pengkulturan Terhadap Bakteri Uji

proses ekstraksi.

Proses ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi. Teknik ini dipilih karena tidak menggunakan panas sehingga tidak akan merusak metabolit sekunder yang tidak tahan panas, selain itu proses penyariannya sederhana yaitu dengan merendam sampel dalam pelarut yang sesuai. Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah etil asetat dengan perbandingan 1:1 v/v, kemudian setelah dipisahkan pelarut diuapkan sampai didapatkan ekstrak kental yang digunakan sebagai sampel pada uji aktivitas antibakteri [19].

Dari enam ekstrak metabolit sekunder isolat yang diujikan, hanya dua isolate yang memiliki aktivitas antibakteri yaitu isolate 3 dan 5 dengan rata-rata diameter hambat >10 mm dengan 2x pengulangan, Menurut Setyaningsih (2008), diameter hambat antara 10-20 mm termasuk kategori dengan aktivitas kuat.

Ekstrak isolat 3 memiliki diameter hambat paling

besar yaitu 13,8 mm terhadap *S. aureus* dengan waktu pengkulturan selama 30 jam, 15,8 mm terhadap *E. coli* dengan waktu pengkulturan selama 30 jam. Aktivitas terbaik terhadap MRSA didapatkan yaitu 13,2 mm dengan waktu pengkulturan selama 36 jam. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 1.

Sedangkan ekstrak isolat 5 memiliki aktivitas paling baik yaitu dengan diameter hambat 13,6 mm terhadap *S. aureus* dengan waktu pengkulturan selama 36 jam, 13,42 mm terhadap *E. Coli* pada waktu pengkulturan selama 42 jam. Sedangkan terhadap MRSA diameter hambatnya <10 mm yaitu 7,22 mm pada waktu pengkulturan selama 36 jam. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 2.

Perbedaan aktivitas masing-masing ekstrak terhadap bakteri Gram negatif dan Gram positif diduga disebabkan karena adanya perbedaan jenis senyawa bioaktif yang dihasilkan dan juga perbedaan struktur dan komposisi dinding sel bakteri. Sedangkan perbedaan zona hambat

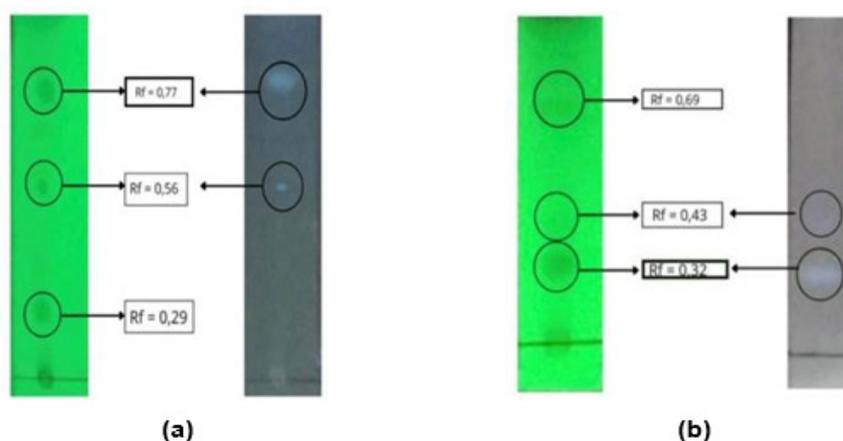
Tabel 2. Hasil Identifikasi Metabolit Sekunder Ekstrak Isolat 3 dan Ekstrak Isolat 5

Uji Metabolit Sekunder	Pereaksi	Kode Ekstrak		Keterangan
		Ekstrak Isolat 3	Ekstrak Isolat 5	
Alkaloid	Mayer	+	+	(+) endapan warna putih (-) tidak ada endapan warna putih
		+	+	(+) endapan warna coklat (-) tidak ada endapan coklat
	Dragendorf	+	+	(+) endapan warna jingga (-) tidak ada endapan warna jingga
Flavonoid	Etanol 95% + Serbuk Mg + HCL pekat	+	+	(+) berwarna merah jingga (-) tidak berwarna merah jingga
Polifenol	FeCl3 10%	-	+	(+) warna biru atau hijau (-) tidak warna biru atau hijau
Saponin	H2O	-	-	(+) berbusa setinggi 1 cm selama 10 menit (-) tidak berbusa setinggi 1 cm selama 10 menit
Steroid dan Terpenoid	CHCl3 + CH3COOH + H2SO4 pekat	-	-	(+) warna biru (-) tidak warna biru
	CHCl3 + CH3COOH + H2SO4 pekat	-	-	(+) warna merah (-) tidak warna merah

pada masing-masing konsentrasi dapat diakibatkan karena perbedaan kandungan zat aktif antimikroba di dalamnya serta kecepatan difusi metabolit sekunder dari isolat ke dalam medium agar. Hasil pengujian dan perbandingan selengkapnya dapat dilihat pada [Tabel 1](#) dan [Gambar 3](#).

Pada isolat 3 dan isolat 5 kemudian dilakukan pemisahan metabolit sekundernya menggunakan plat KLT dengan eluen etil asetat : metanol (9:1). Profil pemisahan dapat dilihat pada [Gambar 5](#).

Pemeriksaan metabolit sekunder digunakan untuk menentukan keberadaan senyawa metabolit sekunder. Berdasarkan pemeriksaan yang dilakukan, kandungan ekstrak etil asetat bakteri endofit dari kulit jeruk nipis (*C. aurantifolia* Swingle) adalah senyawa alkaloid, flavonoid dan polifenol, sedangkan saponin, steroid dan terpenoid tidak ditemukan dalam ekstrak tersebut. Hal ini sesuai dengan pernyataan Tan & Zou (2001) yang menyatakan bahwa bakteri endofit dapat menghasilkan senyawa bioaktif



Gambar 5. Profil Pemisahan KLT terhadap Ekstrak Isolat 3 (a) dan Ekstrak Isolat 5 (b) dengan eluen etil asetat : metanol (9:1). (ket. Warna terang kehijauan dibawah Uv 254 nm sedangkan warna gelap pada Uv 365 nm)

yang karakternya mirip atau sama dengan inangnya. Hasil identifikasi selengkapnya dapat dilihat pada [Tabel 2](#).

Hasil identifikasi isolat 3 secara molekular diketahui dari hasil BLAST pada database NCBI diperoleh homologi sebesar 99,86% dengan nilai Query Cover 100% merupakan *Bacillus velezensis* strain JS25R. Sedangkan isolat 5 dengan pewarnaan Gram memberikan warna ungu yang menyatakan bahwa bakteri ini Gram positif. Bakteri ini merupakan katalase positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas pada akhir pengujian. Dari hasil uji Voges-Proskauer terjadi perubahan warna media menjadi merah atau pink setelah 60 menit penambahan reagen Barrit. Hasil ini menunjukkan bahwa bakteri ini dapat memfermentasi karbohidrat dengan menghasilkan asetoin atau diasetil pada media yang mengandung fosfat, glukosa dan pepton. Dari uji fermentasi karbohidrat (mannitol dan glukosa) didapat hasil bahwa bakteri mampu memfermentasi mannitol dan glukosa ditandai dengan perubahan warna media. Perubahan warna media karena hasil dari fermentasi karbohidrat adalah asam sehingga dapat menurunkan pH, sehingga dengan berubahnya pH akan menyebabkan terjadinya perubahan warna indikator [\[20\]](#).

Kesimpulan

Bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) sebanyak 6 isolat, yang memiliki aktivitas hanya 2 isolat yaitu isolate 3 dan 5. Hasil identifikasi secara molekular isolat 3 adalah *Bacillus velezensis* strain JS25R, isolat 5 adalah *Staphylococcus sp* yang diidentifikasi secara biokimia. Metabolit sekunder dari isolat 3 dan 5 memiliki aktivitas yang kuat terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Methicillin Resistant Staphylococcus (MRSA)* ATCC 43300 dengan diameter hambat rata-rata >10 mm dan potensial untuk dilakukan isolasi dan pengembangan terhadap senyawa metabolit sekunder (Alkaloid, flavonoid, polifenol) yang terkandung pada masing-masing isolat tersebut.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Andalas yang telah mendanai penelitian ini melalui Dana Penelitian dan Pengembangan Dosen Pemula Dana DIPA Fakultas Farmasi tahun anggaran 2021 dengan nomor kontrak 10/UN16.10.D/PJ.01./2021.

Referensi

- [1]. World Health Organization. WHO- The Top 10 Causes of Death. 24 Maggio. 2018. p. 1–7.
- [2]. Arrang ST, Cokro F, dan Sianipar EA. Rational Antibiotic Use by Ordinary People in Jakarta. *Mitra J Pemberdaya Masy*. 2019;3(1):73–82.
- [3]. Mulangsri DAK, Laksanastari R, Amaliyah R, Assyifatul F, dan Kusumadewi AP. Aktivitas Antibakteri Beberapa Fraksi Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *J Cendekia Eksakta*. 2010;2:1–6.
- [4]. Hindun S, Rusdiana T, Abdasah M, dan Hindritiani R. Potensi Limbah Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Sebagai Inhibitor Tirosinase. *Indones J Pharm Sci Technol*. 2017;4(2):64.
- [5]. Herlina T, Julaeha E, Ernawati EE, Darwati, dan Nurzaman M. Antioksidan dari Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Peningkat Imunitas Tubuh dalam Covid-19. *J ITEKIMA*. 2020;8(2):19–29.
- [6]. Ikhsan Zam S, Syamsuardi, Agustien A, Jannah M, Aldi Y, dan Djamaan A. Isolation, Characterization of Endophytic Bacteria from *Citrus aurantifolia* Swingle Leaves and Testing of Antifungal Activity Towards *Fusarium Oxysporum*. *Der Pharm Lett*. 2016;8(11):83–9.
- [7]. Agustien A, Santoso P, Permata Sari N, Annisa F, Nasir N, dan Rilda Y. Screening of Endophyte Piper betle Bacteria from the Forests of HPPB University Andalas as Antibiotics Producer. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2017;(6):5.
- [8]. Somu MP, dan White JF. Endophytes of *Moringa oleifera*: Evaluation of Growth Promotional Features. *MS Student Res Pap*. 2017
- [9]. Irwandi, dan Djamaan A. Pengaruh Konsentrasi Minyak Kelapa Sawit Mentah Terhadap Jumlah Biomassa Bakteri *Bacillus spp*. Penghasil Biopolimer Poli (3-Hidroksibutirat). *J Farm dan Kesehat*. 2018;(1):64–72.
- [10]. Lestari K, Agustien A, dan Djamaan A. Potensi Jamur Endofit pada Tumbuhan Mangrove *Avicennia marina* di Kuala Enok Indragiri Hilir sebagai Penghasil Antibiotika. *J Metamorf*. 2019;6(1):83–9.
- [11]. Saptarini NM, Herawati IE, dan Permatasari UY. Total Flavonoids Content in Acidified Extract of Flowers and Leaves of *Gardenia* (*Gardenia jasminoides* Ellis). *Asian J Pharm Clin Res*. 2016;(9):5.
- [12]. Jones W, dan Kinghorn A. Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: Sharker, S. D, Latif, Z. and Gray. Edisi 1. *Natural Products Isolation*. New Jersey: Humana Press; 2006.
- [13]. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Farmakope Indonesia Edisi Keempat*. Jakarta. 1995.
- [14]. Simes JJ, Tracey JG, Webb L, dan Dunstand W. Saponins in Eastern Australian Flowering Plants. 1959;281:5–8.
- [15]. Safira UM, Pasaribu FH, dan Bintang M. Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Potensinya sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri. *Curr Biochem*. 2017;1(1):51–7.
- [16]. Kumala S, dan Siswanto EB. Isolation and Screening of Endophytic Microbes from *Morinda citrifolia* and their Ability to Produce Anti-Microbial Substances. *Microbiol Indones*. 2007;(3):145–8.
- [17]. Song Q, Huang Y, dan Yang H. Optimization of Fermentation Conditions for Antibiotic Production by *Actinomyces Y1* Strain against *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Agric Sci*. 2012;4(7):95–102.
- [18]. Mukhtarini. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *J Pharm*. 2011.
- [19]. Elita A, Saryono S, dan Christine J. Penentuan Waktu Optimum Produksi Antimikroba dan Uji Fitokimia Ekstrak Kasar Fermentasi Bakteri Endofit *Pseudomonas sp*. dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). 2011;3(2):56–62.
- [20]. Lay, B. W. *Analisis Mikrobiologi di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta. 1994.



Copyright © 2022 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)