

Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan dari Senyawa Bioaktif Asal Bakteri Endofit Tanaman Nyatoh (*Palaquium amboinense* B.)

Antibacterial and Antioxidant Properties of Bioactive Compounds Derived from Endophytic Bacteria Isolated from Nyatoh (*Palaquium amboinense* B.)

RAYHAN HELMYANA PUTRA¹, DWI RETNOWATI², DATU MUHAMMAD CORDOVA³, ALIYA AZKIA ZAHRA³, GIAN PRIMAHAANA⁴, RIZNA TRIANA DEWI⁴, EUIS FILAILLA⁵, SUKIRNO⁴, MUHAMMAD EKA PRASTYA^{4*}

¹Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Garut, Jl. Jati No. 42B, Garut 44151

²Sekolah Tinggi Intelijen Negara. Jl. Sumur Batu, Babakan Madang, Bogor 16810

³Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Singaperbangsa Karawang, Jl. HS. Ronggo Waluyo, Telukjambe Timur, Karawang 41361

⁴Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Kawasan Sains dan Teknologi (KST) B.J Habibie (PUSPIPTEK) Serpong, Tangerang Selatan 15314

⁵Pusat Riset Kimia, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Kawasan Sains dan Teknologi (KST) B.J Habibie (PUSPIPTEK) Serpong, Tangerang Selatan 15314

Diterima 20 Februari 2024/Diterima dalam Bentuk Revisi 2 Maret 2024/Disetujui 6 Maret 2024

Nyatoh plant (*Palaquium amboinense* B.) is native to Indonesia which is known to have the ability to produce potential secondary metabolites. The aim of this study was to evaluate the antibacterial and antioxidant activities from bioactive compounds produced by endophytic bacteria from nyatoh leaves. Five endophytic bacteria were tested against 4 targeted bacteria including *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Bacillus subtilis* ATCC 19659, and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Bacterial isolate which had the strongest antibacterial activity was then fermented and extracted. The corresponding extract was further tested on disc diffusion method, determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values, antioxidant evaluation, and analyzed for its bioactive compound components via GC-MS analysis. The results showed that one isolate, namely D1 can produce secondary metabolite which act as antibacterial and antioxidant potentials. This corresponding extract has the strongest MIC and MBC against *B. subtilis* with value of 39.5 and >78.1 µg/ml and exhibited antioxidant activity against 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) with inhibition value of 85.37%. Based on GC-MS analysis, secondary metabolites derived from this potential extract contained some major active constituents including Tributyl acetylcitrate and bis (2-ethylhexyl) ester which might act as antibacterial and antioxidant agents.

Key words: antibacteria, antioxidant, endophytic bacteria, GC-MS, *Palaquium amboinense*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara tropis yang terkenal dengan sumber daya alam melimpah yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber bahan baku obat. Sebagai negara penghasil sumber daya alam melimpah, Indonesia memiliki potensi yang sangat baik, dimana lebih dari 9.609 spesies tanaman Indonesia diketahui memiliki khasiat sebagai bahan

obat (Yassir & Asnah 2018). Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan obat, bumbu, minuman dan kosmetik untuk menjaga kesehatan dan kualitas hidup masyarakat Indonesia sudah sejak lama dilakukan secara turun temurun. Pemanfaatan tersebut karena tumbuhan banyak mengandung beragam senyawa bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan serta mampu mencegah beragam jenis penyakit (Pratap *et al.* 2013). Tanaman Nyatoh (*Palaquium amboinense* B.) merupakan kelompok jenis pohon kayu yang memiliki nama daerah bengku, balem, pundi, nyatoh (Sumatera), kisawo, jengkot, kawang, kibangkong,

*Penulis korespondensi:
E-mail: meka001@brin.go.id

tanjungan (Jawa), Baringin, hangkang, katiau, Nyatu (Kalimantan), maneo atau koaaf (Nusa Tenggara) (Anggraeni & Dendang 2009). Tanaman ini merupakan tanaman asli Indonesia yang diketahui memiliki potensi untuk menghasilkan beragam jenis senyawa metabolit sekunder. Tanaman ini memiliki senyawa aktif dengan manfaat sebagai obat antidiare, dan ekspektoran (Wibisono *et al.* 2020). Namun, pemanfaatan sumber daya alam di Indonesia termasuk tanaman Nyatoh masih sangat terbatas digunakan sebagai bahan bangunan (kayu), oleh sebab itu diperlukan kajian lain terhadap penggunaan tanaman ini sebagai bahan baku pengobatan (Hidayat & Hardiansyah 2012).

Saat ini pemanfaatan bakteri endofit sebagai penghasil senyawa metabolit sekunder sedang berkembang. Bakteri endofit merupakan bakteri (asosiasi) yang hidup secara koloni di dalam jaringan tanaman (akar, batang, daun, buah, bunga, dan biji) dengan memanfaatkan nutrisi hasil metabolisme tanaman inang. Bakteri endofit memiliki potensi menghasilkan berbagai senyawa metabolit sekunder yang merupakan hasil interaksi dengan tanaman inangnya (Pratiwi 2019). Lebih dari satu jenis bakteri endofit dapat diisolasi dari satu tanaman inang dan berpotensi memproduksi satu atau lebih senyawa metabolit sekunder, bahkan memiliki bioaktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan tanaman inangnya (Strobel & Daisy 2003). Bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman nyatoh diduga dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder hasil interaksi dengan tanaman inangnya akibat transfer genetik dari tanaman inang ke dalam bakteri (Tan & Zou 2001). Hal ini didukung oleh penelitian Wibisono *et al.* (2020) yang menyatakan bahwa tanaman inang dari bakteri endofit tanaman nyatoh memiliki kemampuan sebagai antidiare dan ekspektoran.

Pada umumnya, penelitian bakteri endofit pada tanaman obat terfokuskan pada isolasi senyawa flavonoid dan fenolik hingga pemanfaatan sebagai antibakteri dan antioksidan (Putri & Herdyastuti 2021). Demikian pula dengan tanaman nyatoh, penelitian bakteri endofit dari tanaman nyatoh masih belum ada atau sangat terbatas dalam pemanfaatan sebagai antibakteri dan antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi potensi bakteri endofit yang berasosiasi dengan daun tanaman Nyatoh dan kemampuannya dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder sebagai antibakteri dan antioksidan.

BAHAN DAN METODE

Penapisan Isolat Bakteri Endofit Menggunakan Metode Uji Antagonis. Penelitian ini menggunakan lima isolat bakteri endofit yang diisolasi dari daun tanaman nyatoh, koleksi dari Dr. M. Eka Prastya yang diperoleh dari penelitian sebelumnya. Uji antagonis dilakukan sebagai penapisan awal aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji strain ATCC. Bakteri uji yang digunakan meliputi *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *B. subtilis* ATCC 19659, dan *S. aureus* ATCC 6538 koleksi dari Laboratorium Mikrobiologi, Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Kawasan Sains dan Teknologi B.J. Habibie, Serpong. Masing-masing bakteri uji dikultur pada media *Nutrient Broth* (NB) pada shaker inkubator dengan kecepatan 120 rpm dan suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Selanjutnya, 1,5% (v/v) dari masing-masing kultur bakteri uji ($\pm 1 \times 10^5$ CFU/ml) diinokulasi ke dalam media *Nutrient Agar* (NA) yang masih cair ($\pm 40^{\circ}\text{C}$) dan dituangkan ke cawan petri steril. Setelah memadat, bakteri endofit yang telah diremajakan sebelumnya selama 24 jam digoreskan membulat di atasnya. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dengan suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$. Adanya aktivitas antibakteri dibuktikan dengan munculnya zona hambat di sekitar koloni bakteri endofit (Priyanto *et al.* 2023).

Fermentasi dan Ekstraksi Metabolit Sekunder. Isolat bakteri endofit potensial diekstraksi metabolit sekundernya untuk mendapatkan ekstrak kasar. Masing-masing isolat dibuat kultur *starter* ke dalam media *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya, masing-masing kultur *starter* diinokulasikan ke dalam media NB baru sebanyak 1 Liter. Fermentasi diinkubasi pada shaker inkubator selama 72 jam dengan suhu $28-29^{\circ}\text{C}$ pada kecepatan 120 rpm. Setiap satu liter kultur bakteri ditambahkan etil asetat dengan perbandingan volume 1:1 (v/v) dan di simpan pada *shaker* inkubator dengan suhu $28-29^{\circ}\text{C}$ pada kecepatan 180 rpm selama 60 menit. Lapisan pelarut etil asetat dipisahkan dan diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kasar (Prastya *et al.* 2019).

Uji Aktivitas Antibakteri Difusi Cakram. Sebanyak 1,5% (v/v) dari kultur bakteri uji yang telah diinokulasi sebelumnya ke dalam media NB (diinkubasi 24 jam) diinokulasi ke dalam media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang masih cair ($\pm 40^{\circ}\text{C}$) kemudian dituangkan pada cawan petri steril dan dibiarkan memadat. Ekstrak kasar bakteri endofit

yang sudah didapatkan (10.000 µg/ml) dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (DMSO) sebanyak 20 µL dan diteteskan pada kertas cakram steril (±6 mm). Selanjutnya, diletakkan kertas cakram di permukaan media MHA yang sudah memadat dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Adanya aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan munculnya zona hambat di sekitar cakram. Tetrasiklin (100 µg/ml) dan DMSO 99% digunakan masing-masing untuk kontrol positif dan kontrol negatif (Priyanto *et al.* 2022).

Penentuan Nilai Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dan Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Penentuan nilai MIC dan MBC dilakukan dengan metode microbroth-dilution (Prastya *et al.* 2022). Suspensi ekstrak bakteri 10.000 µg/ml diencerkan dengan DMSO 99% dengan konsentrasi 78.125 µg/ml dalam 96-well plate. Setiap konsentrasi ekstrak dicampurkan dengan media *Mueller Hinton Broth* (MHB) dengan volume yang sama hingga mencapai volume 200 µL. Selanjutnya, 100 µL dari masing-masing bakteri uji yang telah dikultur selama 24 jam disesuaikan dengan standar McFarland 0,5 dalam NaCl 0,85% yang setara dengan 10⁸ CFU/ml bakteri ditambahkan ke setiap sumur dan diinkubasi selama 24 jam pada shaker inkubator dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ±37°C. Tetrasiklin dan DMSO masing-masing digunakan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif. Nilai MIC ditentukan dengan kejernihan masing-masing sumur yang merupakan konsentrasi MIC. Nilai MBC ditentukan dari konsentrasi ekstrak terendah yang dapat membunuh sel bakteri secara total.

Uji Antioksidan Metode DPPH. Sebanyak 100 µL ekstrak bakteri dengan konsentrasi 1.000 µg/ml ditambahkan dengan 100 µL radikal DPPH dengan konsentrasi 2,5 µM dan diinkubasi selama 30 menit kondisi gelap pada suhu ±28°C. Kemudian, diukur absorbansi dengan *Varioskan Flash (Thermo-Fischer)* pada panjang gelombang 515 nm. Presentase hambatan ditentukan berdasarkan rumus dibawah ini:

$$\left(\frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100\%$$

Absorbansi kontrol adalah absorbansi methanol + radikal DPPH, sedangkan absorbansi sampel adalah absorbansi sampel + DPPH (Prastya *et al.* 2019).

Analisis Ekstrak Potensial dengan GC-MS. Analisis kromatografi gas (GC) spektrometri massa (MS) dilakukan menggunakan *Agilent 19091S-433:93,92873 GC-MS* (Prastya *et al.* 2023). Sebanyak 1 µL sampel dilarutkan dalam pelarut *n*-heksan dan diinjeksikan ke dalam kolom HP-5MS

5% *Phenyl Methyl Silox* 0 °C-325 °C (325 °C): 30 m × 250 µm × 0,25 µm. Gas helium digunakan sebagai gas pembawa dengan laju alir 1 ml/menit dengan suhu awal 40°C secara bertahap selama 30 menit hingga 300°C pada tekanan 7,0699 psi dan kecepatan rata-rata 36.262 cm/detik. Perangkat lunak *MSD Chem-Station* digunakan untuk menganalisis hasil GC-MS.

HASIL

Aktivitas Antibakteri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dua dari lima isolat bakteri endofit yaitu (D1, D2) memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri terhadap empat bakteri uji yaitu *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, dan *S. aureus*. Selain itu, isolat bakteri endofit D2 juga diketahui memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan terhadap bakteri *B. subtilis* dan *S. aureus* dengan kemampuan menghambat tidak lebih baik dari D1 (Tabel 1). Potensi bakteri endofit D1 diperkuat dengan hasil difusi cakram yang menunjukkan zona hambat terhadap bakteri *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* dan zona hambat tertinggi pada bakteri *B. subtilis* (Tabel 2).

Nilai Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dan Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Ekstrak kasar dari isolat bakteri endofit D1 diketahui memiliki kemampuan menghambat berbagai bakteri dengan nilai konsentrasi yang beragam. Nilai MIC dan MBC terendah diperoleh pada penghambatan terhadap bakteri *B. subtilis* sebesar 39,5 µg/ml (Tabel 3).

Antioksidan metode DPPH. Selain diketahui memiliki kemampuan aktivitas antibakteri, ekstrak

Tabel 1. Aktivitas antibakteri dari bakteri endofit berdasarkan metode uji antagonis

Bakteri endofit	Zona hambat (mm)*			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
D1	+	++	+	++
D2	-	-	+	+
D3	-	-	-	-
D4	-	-	-	-
D5	-	-	-	-

*-:tidak aktif; +: kurang aktif (diameter zona hambat: ≤5 mm), ++: aktivitas sedang (diameter zona hambat: 6-10 mm), +++: aktivitas kuat (Diameter zona hambat: >10 mm)

Tabel 2. Aktivitas antibakteri ekstrak bakteri endofit D1 menggunakan metode difusi cakram

Sampel*	Zona hambat (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
Ekstrak D1	4,03±0,97	2,16±1,37	4,75±1,11	3,21±2,36
Tetrasiklin	6,35±2,19	3,64±1,90	4,90±0,80	3,96±2,44
DMSO	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

*Ekstrak D1 (10.000 µg/ml), Tetrasiklin (100 µg/ml), dan DMSO 99%

bakteri endofit D1 diketahui memiliki kemampuan dalam menghasilkan senyawa antioksidan melalui pengujian DPPH dengan nilai inhibisi dari konsentrasi ekstrak 1.000 µg/ml sebesar 85,37% (Tabel 4).

Analisis GC-MS. kromatogram dari ekstrak bakteri endofit D1 menggunakan kromatografi gas (GC) spektrometri massa (MS) terdeteksi 9 senyawa dominan yang didominasi oleh Tributyl acetyl citrate dengan kemiripan mencapai 97% (Tabel 5). Hal ini diperkuat dengan hasil kromatogram yang memiliki kelimpahan sebesar 31,72% dengan waktu retensi 22,651 (menit) dengan rumus molekul yang ditunjukkan adalah $C_{20}H_{34}O_8$ (Gambar 1).

PEMBAHASAN

Kemampuan isolat D1 dan D2 dalam menghambat pertumbuhan bakteri menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut berpotensi menghasilkan senyawa antibakteri dan memungkinkan untuk memiliki kemampuan sebagai antibiofilm. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Solatani *et al.* (2022) dibuktikan bahwa isolat yang memiliki kemampuan

Tabel 4. Aktivitas antioksidan ekstrak bakteri endofit D1

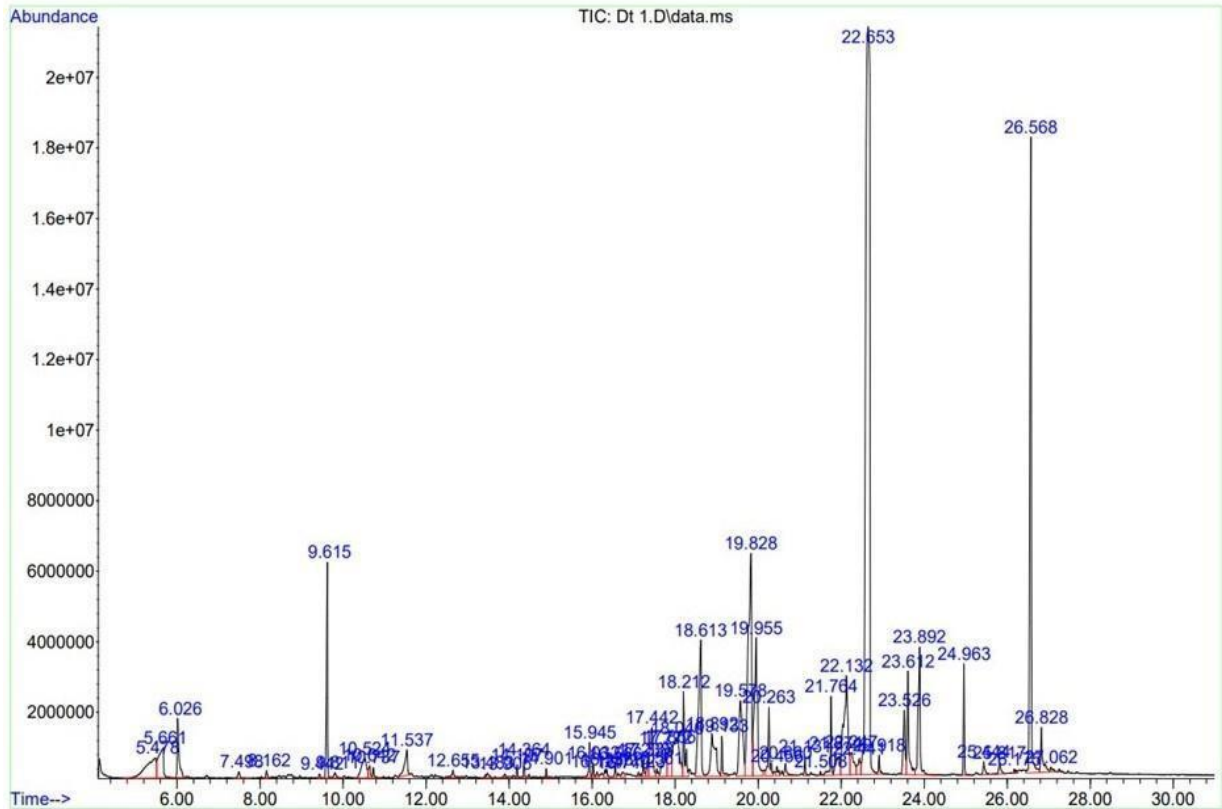
Sampel*	Aktivitas antioksidan
	DPPH (% inhibisi)
Ekstrak D1	85,37±9,27

Tabel 3. Nilai KHM dan KBM ekstrak bakteri endofit D1

Sampel	Nilai KHM dan KBM (µg/ml)							
	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>S. aureus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Ekstrak D1	625	>1250	625	>1250	39,5	>78,1	625	>1250
Tetrasiklin	3,91	>7,81	3,91	>7,81	3,91	>7,81	15,62	31,25

Tabel 5. Senyawa dominan dalam ekstrak bakteri endofit

Senyawa	Rumus molekul	Kelimpahan (%)	Waktu retensi (menit)	Kemiripan (%)	Bioaktivitas	Referensi
Tributyl acetyl citrate	$C_{20}H_{34}O_8$	31,72	22,651	94	Antiinflamasi, antibakteri, antioksidan	Kouidhi <i>et al.</i> 2021
bis (2-ethylhexyl) ester	$C_{24}H_{38}O_4$	9,35	26,571	95	Antioksidan, dekolorisasi	Abu-Hussien <i>et al.</i> 2022
Pyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)	$C_{11}H_{18}N_2O_2$	7,80	19,828	70	Antioksidan, antibakteri	Manimaran & Kannabiran 2017
Cyclo(L-prolyl-L-valine)	$C_{10}H_{16}N_2O_2$	3,75	18,618	98	Antibakteri, antikanker, anti-quorum sensing	Kaari <i>et al.</i> 2021
Pyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione,8hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	$C_{11}H_{18}N_2O_2$	2,89	19,576	83	Antioksidan	Kouidhi <i>et al.</i> 2021
Pyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)	$C_{14}H_{16}N_2O_2$	2,76	23,886	98	Antibakteri (multidrug resistance), antioksidan	Kiran <i>et al.</i> 2018
Pyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione, hexahydro-	$C_{10}H_{16}N_2O_2$	2,53	18,051	96	Antibakteri, antikanker	Lalitha <i>et al.</i> 2016
9-Octadecenamide	$C_{18}H_{35}NO$	1,83	23,609	99	Antioksidan	Khan <i>et al.</i> (2019)
1,4-diazabicyclo[4.3.0] nonan-2,5-dione, 3-methyl	$C_{10}H_{14}N_2O_3$	1,53	17,446	95	Antimikrob	Abu-Hussien <i>et al.</i> 2022



Gambar 1. Kromatogram ekstrak bakteri endofit D1

sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *S. aureus* juga memiliki kemampuan dalam biodegradasi antibiofilm.

Biofilm didefinisikan sebagai kumpulan sel-sel mikroba yang melekat pada suatu permukaan. Biofilm merupakan salah satu mekanisme dari resistensi antibiotik terhadap beberapa bakteri patogen yang meningkatkan patogenisitasnya. Infeksi dari biofilm telah menjadi isu global penyebab utama terjadinya *Health care Associated Infection* (HAIs). Tidak hanya terbentuk secara efisien pada jaringan manusia, biofilm juga terbentuk pada alat-alat medis (Esser *et al.* 2015). Menurut *World Health Organization* (WHO), sepertiga dari kematian di seluruh dunia pada tahun 2011 disebabkan oleh penyakit menular. Setidaknya 80% dari infeksi penyakit menular dari mikroorganisme pada manusia melibatkan biofilm (Romling & Balsalobre 2012). Hal ini didukung oleh pernyataan Balagurunathan *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa biofilm telah ditemukan terlibat dalam berbagai macam infeksi mikroorganisme pada tubuh. Potensi isolat bakteri endofit D1 sebagai antibakteri diperkuat dengan hasil difusi cakram pada ekstrak kasar yang menunjukkan zona hambat pada setiap bakteri uji. Zona hambat terendah dihasilkan pada bakteri *P. aeruginosa* dan zona hambat tertinggi pada bakteri *B. subtilis* (Tabel 2).

Ekstrak kasar dari isolat D1 juga diketahui memiliki kemampuan dalam menghambat berbagai bakteri dengan nilai yang beragam. Nilai MIC dan MBC terkuat diperoleh terhadap penghambatan bakteri *B. subtilis* (Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak bakteri endofit tanaman Nyatoh dapat menghambat hingga membunuh bakteri dengan nilai konsentrasi yang rendah. Penelitian ini juga dilakukan uji konfirmasi terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri dengan menggunakan tetrasiklin sebagai kontrol positif. Tetrasiklin merupakan antibiotik yang termasuk ke dalam kelompok dengan spektrum yang luas yang dapat menghambat pertumbuhan hingga membunuh bakteri baik Gram positif maupun Gram negatif (Susilawati *et al.* 2023).

Selain diketahui memiliki kemampuan sebagai antibakteri dan antibiofilm, ekstrak bakteri endofit D1 juga diketahui memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa antioksidan melalui pengujian DPPH (Tabel 4). Senyawa antioksidan dapat menangkal radikal bebas di dalam tubuh manusia. Ketidakseimbangan jumlah radikal bebas dapat menyebabkan rusaknya fungsi pembuluh darah dan merusak laporan lemak pada dinding sel hingga mengurangi kemampuan adaptasi sel (Izyumov *et al.* 2010). Metode DPPH dilakukan karena memiliki beberapa keunggulan dalam pengujian aktivitas

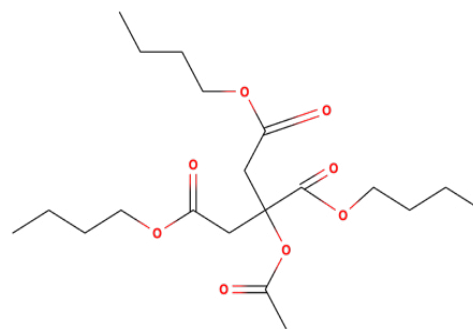
senyawa antioksidan yaitu dapat menggunakan sampel yang sedikit dengan waktu yang singkat (Keinanen & Ritta 1996). Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menimbulkan perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Tingkat perubahan warna yang mengindikasikan potensi senyawa antioksidan dalam kemampuannya men-donorkan atom hidrogen (Mosquera *et al.* 2007). Semakin tinggi konsentrasi berarti semakin banyak pula senyawa yang menyumbangkan elektron atau hidrogennya pada radikal bebas DPPH yang menyebabkan perubahan pemudaran warna pada DPPH. Saat dalam bentuk radikal, DPPH cenderung tidak stabil (reaktif) dan memiliki energi yang besar karena selalu bereaksi mencari pasangan elektronnya, namun setelah mendapat pasangan elektronnya, DPPH menjadi lebih stabil (energinya rendah) (Martiningsih *et al.* 2016).

Hasil pengujian antioksidan metode DPPH, ekstrak bakteri endofit D1 dengan konsentrasi 1.000 µg/ml menunjukkan nilai persen inhibisi yang tinggi pada 85,37% (Tabel 4). Tingginya persen inhibisi terjadi karena konsentrasi yang dipakai juga tinggi. Hal ini didukung oleh Hanani *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa presentase penghambatan (persen inhibisi) terhadap radikal bebas akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi.

Untuk mengidentifikasi senyawa yang diduga memiliki kemampuan sebagai antibakteri dan antioksidan, pada penelitian ini dilakukan dengan Gas Chromatography-Mass Spectrometri (GC-MS). Keunggulan menggunakan metode GC-MS dibandingkan dengan metode yang lain adalah metode GC-MS memiliki sensitivitas tinggi sehingga dapat memisahkan senyawa yang saling bercampur dan mampu menganalisis berbagai senyawa walaupun dalam konsentrasi rendah. Metode GC-MS merupakan metode dengan pemisahan sampel yang dilakukan dengan metode kromatografi gas sedangkan analisis menggunakan Mass Spectroscopy (Candraningrat *et al.* 2021).

Hasil penelitian ini didapatkan hasil dari kromatogram dengan dugaan sembilan senyawa yang dominan. Senyawa ekstrak bakteri endofit ini didominasi oleh *Tributyl acetylcitrate* (Gambar 2) dengan nilai kelimpahan 31,72% dan kemiripan 97% (Tabel 5). Senyawa ini sejalan dengan penelitian Koudhini *et al.* (2021) yang menyatakan bahwa senyawa *Tributyl acetylcitrate* memiliki kemampuan dalam menghasilkan senyawa antibakteri dan antioksidan.

Tributyl acetylcitrate merupakan senyawa metabolit sekunder dengan rumus kimia $C_{20}H_{34}O_8$ yang terbukti memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Senyawa ini juga telah dibuktikan oleh beberapa penelitian



Gambar 2. Senyawa *Tributyl acetylcitrate*

berpotensi sebagai antibakteri dan anti fungi (Olagunju *et al.* 2006; Karthihwaran *et al.* 2012; Hamza *et al.* 2015). Ekstrak dari senyawa metabolit sekunder ini diketahui memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan dari bakteri patogen yaitu *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, dan *S. aureus*. Selain penghambatan pertumbuhan bakteri, senyawa *Tributyl acetylcitrate* juga diketahui memiliki aktivitas antifungi pada beberapa fungi yaitu *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium sp.*, *Microsporium canis*, *Streptococcus faecalis*, *Mucor sp.*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma horzianum* and *Trichophyton mentagrophytes* (Abu-Hussien *et al.* 2022). Senyawa aktif yang diperoleh pada penelitian ini tidak hanya diketahui sebagai antibakteri dan antioksidan (Tabel 5). Hal ini menunjukkan bahwa potensi yang dimiliki oleh senyawa metabolit sekunder dari penelitian ini lebih luas dan perlu dikaji lebih mendalam untuk membuktikan potensi-potensi lainnya.

Bakteri endofit dari tanaman Nyatoh diketahui memiliki kemampuan dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder (*Tributyl acetylcitrate*) yang berpotensi sebagai antibakteri dan antioksidan. Selain itu, senyawa metabolit sekunder tersebut berpotensi untuk mengatasi berbagai macam infeksi bakteri melalui kemampuannya dalam menghasilkan senyawa antibakteri. dengan penelitian lebih lanjut diharapkan juga bakteri endofit ini memiliki kemampuan dalam menghasilkan senyawa pendegradasi biofilm. Senyawa tersebut juga berperan dalam resistensi bakteri terhadap antibiotik. Selain itu dengan kemampuan bakteri endofit ini dalam menghasilkan senyawa antioksidan diharapkan dapat menjadi kandidat produksi senyawa yang dapat mendegradasi radikal bebas, sehingga akan menghambat pertumbuhan penyakit-penyakit degeneratif. Potensi-potensi yang ada pada bakteri endofit tanaman Nyatoh menunjukkan bahwa eksplorasi senyawa metabolit sekunder memberi peluang untuk memperoleh senyawa potensial di masa depan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Organisasi Riset Kesehatan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Indonesia yang telah mendanai penelitian ini melalui skema pendanaan rumah program Purwarupa Bahan Baku Obat Terapi Terarah kepada MEP, tahun 2024.

DAFTAR PUSTAKA

- Abu-Hussien HS, Hemdan B, Alzahrani O, Alswat A, Alatawi F, Alenezi M, El-Sayed S. 2022. Microbial degradation, spectral analysis and toxicological assessment of Malachite Green Dye by *Streptomyces exfoliatus*. *Molecules* 27:1-23. <https://doi.org/10.3390/molecules27196456>
- Anggraeni I, Dendang B. 2009. Penyakit bercak daun pada semai nyatoh (*Palaquium* sp.) di persemaian balai penelitian kehutanan ciamis. *Jurnal Penelitian Hutan Tanaman* 6:99-108.
- Balagurunathan R, Sangeetha M, Shanmugasundaram. 2015. Antibiofilm compounds from actinobacteria. *ENVIEWS Newslette* 13:1-4.
- Candraningrat IDAA, Santika A, Dharmayanti I, Prayascita PW. 2021. Review kemampuan metode GC-MS dalam identifikasi Flunitrazepam terkait dengan aspek forensik dan klinik. *Journal of Chemistry* 15:12-19. <https://doi.org/10.24843/jchem.2021.v15.i10.p03>
- Esser DS, Leveau JHJ, Meyer KM. 2015. Modeling microbial growth and dynamics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:8831-8846. <https://doi.org/10.1007/s00253-0156877-6>
- Hamza LF, Kamal SA, Hameed IH. 2015. Determination of metabolites products by *Penicillium expansum* and evaluating antimicrobial activity. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* 7:194-220. <https://doi.org/10.5897/JPP2015.0360>
- Hanani E, Mun'im B, Sekarini R. 2005. Identifikasi senyawa antioksidan dalam spons *Callispongia* sp. dari Kepulauan Seribu. *Jurnal Ilmu Kefarmasian* 2:127-133. <https://doi.org/10.7454/psr.v2i3.3389>
- Hidayat D, Hardiansyah G. 2012. Studi keanekaragaman jenis tumbuhan obat di kawasan IUPHHK PT. Sari Bumi Kusuma Camp Tontang Kabupaten Sintang. *Journal Biology Science* 8:61-68.
- Izyumov DS, Domnina LV, Neprayakhina OK, Avetisyan AV, Golyshev SA, Ivanova OY, Korotetskaya MV, Lyamzaev KG, Pletjushkina OY, Popova EN, Chernyak BV. 2010. Mitochondria as source of reactive oxygen species under oxidative stress, study with novel mitochondria-targeted antioxidant-"the skulachev-ion" derivatives. *Biochem* 75:123-129. <https://doi.org/10.1134/s000629791002001x>
- Kaari M, Joseph J, Manikkam R, Sreenivisan A, Venugopal G. 2021. Metabolite profiling of plant growth promoting and antagonistic *Streptomyces* sp. UT6A57 effective against *Railstonia solanacearum*. *International Journal of Advance and Innovative Research* 8:287-446.
- Karthishwaran K, Muthukkumarasamy S, Sankara M. 2012. GCMS analysis of methanolic extract of aerial parts of *Pergularia daemia*. *Journal of Life Science* 1:50-55.
- Keinanen M, Ritta JT. 1996. Effect of sample preparation method on birch (*Betula pendula* Roth) leaf phenolics. *Journal Agriculture Food Chem* 44:2724-2727. <https://doi.org/10.1021/jf960168x>
- Khan S, Richa, Kaur H, Jhamta R. 2019. Evaluation of antioxidant potential and phytochemical characterization using GCMS analysis of bioactive compounds of *Achillea filipendulina* (L.) leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 8:258-265.
- Kiran G, Priyadharsini S, Sajayan A, Ravindran A, Selvin, J. 2018. An antibiotic agent pyrrolo (1,2-1) pyrazine-1,4-dione, hexahydro isolated from amarine bacteria *Bacillus tequilensis* MS145 effectively controls multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *The Royal Society of Chemistry* 8:1783-1786. <https://doi.org/10.1039/c8ra00820e>
- Kouidhi S, Zidi O, Abdelwahed A, Soussi Y, Trabelsi N, Redissi A, Mosbah A. 2021. Investigation of the chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of *Labularia maritima*: potent therapeutic applications. *Hindawi Journal of Chemistry* 21:1-12. <https://doi.org/10.1155/2021/1981680>
- Lalitha P, Veena V, Vidhyapriya P, Lakshmi P, Krishna R. 2016. Anticancer potential of pyrrole (1, 2, a) pyrazine 1, 4, dione, hexahydro 3-(2-methyl propyl) (PPDHMP) extracted from a new marine bacterium, *Staphylococcus* sp. strain MB30. *Apoptosis* 21:566-577. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1221-x>
- Manimaran M, Kannabiran K. 2017. Marine *Streptomyces* sp. VITMK1 derived pyrrolo (1,2A) Pyranie-1, 4-Dione, Hexahydro-3-(2-Methylpropyl) and its free radical scavenging activity. *The Open Boiactive Compounds Journal* 5:23-30. <https://doi.org/10.2174/1874847301705010023>
- Martiningsih N, Widana G, Kristiyanti P. 2016. Skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun matao (Pometia Pinnata) dengan metode DPPH. *Prosiding Seminar Nasional MIPA* 1:332-338.
- Mosquera O, Corea Y, Buitrago D, Nino J. 2007. Antioxidan activity of twenty five plants from colombian biodiversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:631-634. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000066>
- Olagunju J, Fagbohunka B, Oyedapo O, Abdul A. 2006. Effects of an ethanolic root extract of *Plumbago zeylanica* L on some serum parameters of the rats. *RPMP-Drug Dev Mol* 11:268-276.
- Prastya ME, Septama AW, Mozef TS, Rahayu S. 2022. Antimicrobial and antibiofilm activities derived from indonesian *Toona ciliata* leaves extract. *AIP Conference Proceedings* 1-6. <https://doi.org/10.1063/5.0109913>
- Prastya ME, Astuti R, Batubara I, Wahyudi A. 2019. Antioxidant, antiglycation and *in vivo* antiaging effects of metabolite extracts from marine sponge-associated bacteria. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 81:344-353. <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.516>
- Prastya ME, Simbolon S, Priyanto JA, Yuswan A, Permatasari V, Primahana G, Dewi RT. 2023. Antioxidant, cytotoxic properties, and chemical constituents of soil *Streptomyces* spp. Isolated from Muna Island, Southeast Sulawesi, Indonesia. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 1271:1-10. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1271/1/012060>
- Pratap B, Chakraborty G, Mogha N. 2013. Completed aspects of *Altsonia scholaris*. *International Journal of PharmTech Research* 5:17-26.
- Pratiwi R. 2019. Peranan mikroorganisme endofit dalam dunia kesehatan: kajian pustaka. *Jurnal Ilmiah Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam* 16:21-32. <https://doi.org/10.31851/sainmatika.v16i1.2695>
- Priyanto JA, Prastya ME, Sinarwadi G, Datu'salamh W, Avelina T, Yanuar A, Mozef T. 2022. The antibacterial and antibiofilm potential of *Paederia foetida* Linn. leaves extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 12:117-124. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2022.121012>
- Priyanto JA, Prastya ME, Astuti RI, and Kristiana R. 2023. The antibacterial and antibiofilm activities of the endophytic bacteria associated with *Archidendron pauciflorum* against multidrug resistant strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 195:6653-6674. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04382-4>
- Putri RDW, Herdyastuti N. 2021. Potensi senyawa antioksidan yang dihasilkan bakteri endofit pada daun jambu biji (*Psidium guajava* L.). *UNESA Journal of Chemistry* 10:55-63. <https://doi.org/10.26740/ujc.v10n1.p55-63>
- Romling U, Balsalobre C. 2012. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine* 272:541-561. <https://doi.org/10.1111/joim.12004>
- Soltani N, Samane A, Sevda B, Elham T, Mahdieh F, Parisa E, Firouz A. 2022. Antibacterial and antibiofilm activity of *Lactobacillus strains* secretome and extraction againts *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection. *Biotechnology Reports* 36:1-5. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00760>

- Strobel G, Daisy B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Review* 67:491-502. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003>
- Susilawati S, Fakih T, Rusdi B. 2023. Identifikasi struktur pada antibiotika golongan tetrasiklin yang memberikan efek toksik dengan uji *in-silico*. *Bandung Conference Series: Pharmacy* 3:441-449. <https://doi.org/10.29313/bcsp.v3i2.8900>
- Tan R, Zou W. 2001. Endophyte: A rich source of functional metabolite. *Natural Product Report* 1:448-459. <https://doi.org/10.1039/b100918o>
- Wibisono A, Sunardi, Radam R. 2020. Fitokimia 5 jenis pohon di KHDTK Universitas Lambung Mangkurat Mandiangin Kalimantan Selatan. *Jurnal Sylva Scientiae* 3:422-431. <https://doi.org/10.20527/jss.v3i3.2175>
- Yassir M, Asnah. 2018. Pemanfaatan jenis tumbuhan obat tradisional di Desa Batu Hampan Kabupaten Aceh Tenggara. *Jurnal Biotik* 6:17-34.