

Eksplorasi Bakteri Endofit dari Tanaman *Benincasa hispida* (Kundur) Asal Sulawesi Tenggara dan Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilmnya terhadap *Staphylococcus aureus*

[Exploration of Endophytic Bacteria from *Benincasa hispida* (Kundur) Plants Originating from Southeast Sulawesi and Their Antibacterial and Antibiofilm Activities against *Staphylococcus aureus*]

Ekajayanti Kining¹, Efrita bataragoa², Fitria Dewi¹, A. Ainun Nurfaejrin³

¹ Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Haluoleo, Kendari Indonesia

² Program Studi Bioteknologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Haluoleo, Kendari Indonesia

³ Program Studi Statistik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Haluoleo, Kendari Indonesia

* Email korespondensi : ekakining@uho.ac.id

ABSTRACT

The main problem addressed is the increasing resistance of *S. aureus*, making it necessary to discover new bio-based antibacterial sources. This study aimed to isolate and identify endophytic bacteria from the leaves of *B. hispida* originating from Southeast Sulawesi, and to evaluate their antibacterial and antibiofilm activities against *S. aureus* using the disc diffusion method and crystal violet assay. The research methods included surface and internal tissue sterilization of the plant, isolation of bacterial colonies, Gram staining, metabolite extraction, bioactivity tests, and phytochemical assays. Results indicated one endophytic bacterial isolate with Gram-positive characteristics, and the endophyte extract demonstrated very strong antibacterial activity at a concentration of 200 µg/mL (inhibition zone 22–23 mm, comparable to the positive control). The percentages of growth inhibition and biofilm degradation reached >80% and >70% respectively at the highest concentration. In conclusion, endophytic bacteria from *B. hispida* of Southeast Sulawesi have promising potential as a natural source of antibacterial and antibiofilm agents relevant for therapeutic development against *S. aureus* infections.

Keywords: *Benincasa hispida*; antibacterial; antibiofilm; *S. aureus*; Kendari

ABSTRAK

Permasalahan utama adalah resistensi *S. aureus* yang semakin meluas, sehingga diperlukan sumber antibakteri baru berbasis hayati. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri endofit dari daun tanaman *B. hispida* asal Sulawesi Tenggara serta mengevaluasi aktivitas antibakteri dan antibiofilm terhadap *S. aureus* menggunakan metode difusi cakram dan metode kristal violet. Metode penelitian meliputi sterilisasi permukaan dan jaringan dalam tanaman, isolasi koloni bakteri, pewarnaan Gram, ekstraksi metabolit, serta uji bioaktivitas. Hasil penelitian menunjukkan satu isolat bakteri endofit dengan karakter Gram positif, dan ekstrak endofit menunjukkan aktivitas antibakteri sangat kuat pada konsentrasi 200 µg/mL (zona hambat 22–23 mm, setara kontrol positif). Persentase inhibisi pertumbuhan dan degradasi biofilm mencapai >80% dan >70% pada konsentrasi tertinggi. Simpulan, bakteri endofit *B. hispida* asal Sulawesi Tenggara memiliki potensi sebagai sumber antibakteri dan antibiofilm alami yang relevan untuk pengembangan terapi infeksi *S. aureus*.

Kata kunci: *Benincasa hispida*; antibakteri; antibiofilm; *S. aureus*; Kendari

Pendahuluan

Resistensi antimikroba semakin menjadi perhatian serius di bidang kesehatan global, dengan estimasi 10 juta kematian tahunan akibat infeksi bakteri resisten pada tahun 2050 jika tidak dilakukan intervensi yang tepat (World Health Organization, 2024; Ahmed et al., 2024). Salah satu patogen dengan dampak paling besar adalah *Staphylococcus aureus*, khususnya strain MRSA yang berkontribusi terhadap tingginya angka morbiditas dan mortalitas di fasilitas kesehatan (Siddiqui A.H. et al., 2023; Chamber & Deleo, 2009). Data surveilans WHO periode 2018–2023 menunjukkan tren kenaikan resistensi antibiotik pada lebih dari 40% kombinasi patogen-antibiotik, sementara pengembangan antibiotik baru mengalami pelambatan yang signifikan (World Health Organization, 2025; AHF Institute, 2024; (Ahmed et al., 2024). Dalam situasi ini, pencarian sumber antimikroba alami semakin mendesak sebagai langkah inovatif untuk mengatasi resistensi.

Secara konvensional, tanaman obat dikenal sebagai penyedia senyawa terapeutik potensial, namun penelitian umumnya fokus pada senyawa dari jaringan tanaman, bukan dari mikroorganisme endofitik yang hidup di dalamnya (Islam, M.T et al., 2021; Sharma et al., 2014). *Benincasa hispida*, tanaman tradisional di Asia termasuk Indonesia, kaya akan metabolit seperti flavonoid dan peptida antimikroba. Bukti empiris menunjukkan mikroorganisme endofit dalam tanaman ini dapat menghasilkan metabolit antibakteri, antikanker, dan antioksidan (Gouda et al., 2016). Studi internasional mengonfirmasi sekitar 69% isolat endofit dari tanaman obat berpotensi antimikroba terhadap patogen multidrug-resistant, termasuk MRSA (Beiranvand et al., 2017), sementara penelitian di Indonesia dan Malaysia juga mengidentifikasi aktivitas antibakteri isolat endofit dari berbagai spesies tanaman lokal (Ali & Rante, 2018) ; Radu et al., 2002).

Potensi mikroba endofit telah dibuktikan di berbagai negara, namun eksplorasi dan pemanfaatan bakteri endofit pada tanaman obat wilayah Sulawesi Tenggara, khususnya *B. hispida*, masih sangat minim. Keanekaragaman hayati Sulawesi Tenggara digunakan masyarakat untuk pengobatan tradisional (Tahoangako et al., 2024) namun belum didukung eksplorasi mikroba endofit secara sistematis. Faktor ekologi dan geografi terbukti memengaruhi diversitas endofit dan potensi metabolit yang dihasilkan (Osman et al., 2025), sehingga diperlukan riset khusus untuk mengungkap strain bakteri unik dan metabolit bioaktif baru di kawasan tersebut.

Penelitian ini mengatasi kesenjangan dengan pendekatan terpadu, menggabungkan sterilisasi permukaan, dan bioassay difusi cakram serta dilusi bertingkat sesuai standar CLSI (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021; Murdoch et al., 2012). Inovasi utama penelitian terletak pada eksplorasi mikroba endofit dari *B. hispida* di Sulawesi Tenggara yang belum pernah dilaporkan, dan uji potensi antibakteri serta antibiofilmnya terhadap *S. aureus*. Metode ini memungkinkan evaluasi isolat unggul dan mendukung penemuan mekanisme kerja antimikroba baru.

Adapun tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri endofit daun *B. hispida* dari Sulawesi Tenggara, menguji produksi metabolit sekunder, serta mengevaluasi aktivitas antibakteri dan antibiofilm terhadap *S. aureus* menggunakan metode difusi cakram dan kristal violet. Penelitian juga bertujuan melakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder. Kontribusi signifikan penelitian ini meliputi pemutakhiran data biodiversitas mikroba Indonesia, peta komunitas endofit potensial sebagai sumber kandidat antibiotik baru, dan pengembangan metode kultivasi mikroba ramah lingkungan untuk produksi senyawa bioaktif. Indikator utama keberhasilan adalah jumlah

isolat endofit yang diperoleh, aktivitas antibakteri dan antibiofilm yang terstandar (zona hambat ≥ 10 mm dan %inhibisi $>50\%$).

Bahan dan metode

Desain Penelitian dan Gambaran Umum

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratorium dengan pendekatan eksploratif untuk mengisolasi bakteri endofit dari daun *B. hispida* asal Sulawesi Tenggara. Langkah awal mencakup sterilisasi permukaan sampel, ekstraksi jaringan internal, pengenceran berseri, dan penanaman pada media Nutrient Agar (NA) untuk memperoleh isolat murni. Koloni yang berbeda morfologi diamati, dipilih, dan disubkultur untuk memastikan kemurnian isolat. Identifikasi awal karakter bakteri dilakukan melalui pewarnaan Gram. Selanjutnya, isolat murni dikultur pada media nutrisi cair untuk produksi metabolit sekunder. Supernatan fermentasi diekstraksi menggunakan pelarut organik etil asetat. Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap *S. aureus* metode difusi cakram agar, dengan pengukuran zona hambat untuk menilai potensi isolat. Prosedur termodifikasi dari beberapa penelitian sebelumnya diadaptasi agar sesuai dengan sifat bakteri endofit dari tanaman tropis (Kining et al., 2024).

Sampel dan Subjek Penelitian

Sampel penelitian berupa bagian daun tanaman sehat *B. hispida* yang diperoleh dari satu lokasi di Sulawesi Tenggara. Seleksi sampel dilakukan menggunakan kriteria: tanaman bebas penyakit, tumbuh optimal, dan berasal dari lingkungan yang sama. Setiap bagian tanaman dicuci bersih dan dipotong steril untuk mencegah kontaminasi permukaan. Uji sterilitas dilakukan pada bilasan akhir untuk memastikan mikroorganisme yang diisolasi benar-benar endofitik, bukan epifit. Bahan-bahan yang digunakan antara lain media Nutrient Agar (Himedia®), Nutrient Broth (Himedia®), aquadest, NaCl fisiologis 0,9%, alkohol 70%, Kristal violet, Lugol / Iodin, Alkohol 95%, Safranin, etil asetat, dan kloramfenikol disc (Sensi-disc®).

Prosedur Kerja

a) Isolasi Bakteri Endofit

Isolasi bakteri endofit dilakukan menggunakan metode Internal Tissue Extraction dengan memotong jaringan steril ($\pm 1 \text{ cm}^2$), jaringan dihancurkan dalam mortar steril dengan 5–10 mL aquades steril, diaduk hingga terbentuk suspensi homogen. Simpan suspensi sebagai stok endofit. Selanjutnya, 5 tabung reaksi berisi 9 mL aquades steril, diambil 1 mL suspensi stok, masukkan ke tabung pertama dan homogenkan (10^{-1}). Ambil 1 mL dari tabung pertama, pindahkan ke tabung kedua dan homogenkan (10^{-2}). diulangi hingga pengenceran ke- 10^{-5} . Selanjutnya 0,1 mL dari masing-masing tabung dilusi di sebarakan pada permukaan media Nutrien Agar (NA) menggunakan spreader steril. Inkubasi pada suhu 28–30°C selama 24 jam.

b) 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.

c) Persiapan Kultur Bakteri

Isolat bakteri endofit murni diambil dari media NA dan diinokulasikan ke dalam media cair steril dengan volume 50–200 mL. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 28–30°C selama 3–5 hari hingga mencapai fase stasioner pertumbuhan. Setelah proses fermentasi selesai, kultur disentrifugasi pada 6000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan biomassa sel dan supernatan. Supernatan yang dihasilkan mengandung sebagian besar metabolit sekunder, meskipun beberapa senyawa aktif juga dapat ditemukan pada biomassa. Oleh karena itu, supernatan digunakan sebagai bahan utama untuk tahap ekstraksi metabolit sekunder.

d) Ekstraksi Metabolit Sekunder

Supernatan hasil fermentasi dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian ditambahkan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:1 (v/v). Campuran dikocok perlahan selama ±15 menit sambil melepaskan tekanan secara berkala untuk mencegah kelebihan tekanan gas. Setelah proses pengocokan, campuran didiamkan hingga terbentuk dua fase, yaitu fase air di bagian bawah dan fase organik di bagian atas yang mengandung senyawa aktif. Fase organik dipisahkan dengan hati-hati dan proses ekstraksi diulangi sebanyak dua hingga tiga kali untuk memperoleh hasil yang optimal.

e) Pemekatan Ekstrak (crude ekstrak)

Pelarut organik diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40–45°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental (crude extract) yang dihasilkan disimpan dalam vial tertutup rapat pada suhu 4°C untuk mencegah degradasi senyawa aktif sebelum digunakan pada tahap uji lanjut.

Identifikasi Bakteri Endofit

Identifikasi isolat dilakukan dengan pewarnaan Gram. Uji ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi, Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Halu Oleo. Preparat bakteri diwarnai dengan kristal violet 1% hingga seluruh permukaan tertutup dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir secara perlahan. Selanjutnya, larutan lugol ditambahkan hingga menutupi preparat dan didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas kembali dengan air mengalir. Proses dekolorisasi dilakukan menggunakan alkohol 95% selama 10–20 detik atau hingga aliran alkohol tidak lagi berwarna ungu, kemudian segera dibilas dengan air untuk menghentikan reaksi. Pewarnaan penutup dilakukan dengan safranin 0,5% selama 30–60 detik, diikuti pembilasan dengan air mengalir. Preparat kemudian dikeringkan pada suhu ruang atau dengan pemanasan ringan sebelum diamati.

Uji Aktivitas Antibakteri

Satu koloni bakteri diambil dari media miring kemudian disuspensikan ke dalam larutan NaCl fisiologis 0,9%. Kekeruhan suspensi disesuaikan dengan standar McFarland 0,5, yang setara dengan sekitar 10^8 CFU/mL. Sebanyak 100 μ L suspensi bakteri diinokulasikan secara merata pada permukaan media Nutrient Agar (NA) menggunakan swab steril. Cawan petri kemudian dibiarkan pada kondisi laminar flow selama ±10 menit untuk memastikan permukaan agar mengering secara sempurna. Kertas cakram steril dicelupkan ke dalam larutan ekstrak dengan konsentrasi 25, 50, 100, dan 200 μ g/mL selama ±5 menit. Setelah itu, cakram dikeringkan singkat agar tidak menetes, lalu diletakkan pada permukaan media NA yang telah diinokulasi bakteri. Setiap cawan petri berisi 4–5 cakram dengan jarak antar cakram minimal 2 cm guna mencegah tumpang tindih zona hambat. Sebagai kontrol positif digunakan cakram berisi antibiotik standar, sedangkan kontrol negatif

menggunakan cakram yang telah dicelupkan ke dalam pelarut DMSO tanpa penambahan ekstrak. Seluruh prosedur dilakukan di bawah kondisi aseptik untuk mencegah kontaminasi.

Uji Aktivitas Antibiofilm

a) Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm

Suspensi bakteri disiapkan dalam Nutrient Broth hingga mencapai kerapatan optik setara dengan $OD_{600} = 0,1$, yang mewakili sekitar 10^7 CFU/mL. Sebanyak 100 μ L suspensi bakteri dimasukkan ke dalam setiap well pada mikrotiter plate steril. Selanjutnya, sebanyak 100 μ L larutan ekstrak ditambahkan ke masing-masing well pada berbagai konsentrasi, yaitu 25, 50, 100, dan 200 μ g/mL. Kontrol negatif terdiri atas well yang berisi suspensi bakteri tanpa penambahan ekstrak. Mikrotiter plate kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam tanpa agitasi untuk memungkinkan pembentukan biofilm. Setelah inkubasi, isi well dibuang, dan setiap well dicuci tiga kali menggunakan akuades steril untuk menghilangkan sel yang tidak menempel (non-adherent cells). Mikrotiter plate kemudian dikeringkan pada suhu 60°C selama ± 30 menit untuk proses fiksasi. Selanjutnya, setiap well ditambahkan 200 μ L larutan kristal violet 0,1% dan dibiarkan selama 15 menit untuk mewarnai biofilm yang terbentuk. Setelah pewarnaan, plate dibilas tiga kali menggunakan air steril hingga permukaannya tampak jernih. Pewarna yang terikat pada biofilm kemudian dilarutkan dengan menambahkan 200 μ L etanol 95% ke setiap well dan didiamkan selama 15 menit. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 570 nm menggunakan microplate reader untuk menentukan tingkat pembentukan biofilm.

b) Uji Degradasi Biofilm

Uji penghancuran biofilm dilakukan dengan prosedur serupa, namun biofilm terlebih dahulu dibentuk dengan menginkubasi suspensi bakteri selama 24 jam pada suhu 37°C . Setelah biofilm terbentuk, medium cair diganti dengan larutan ekstrak pada konsentrasi yang sama seperti uji penghambatan, kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam berikutnya. Setelah perlakuan, proses pencucian, pewarnaan, dan pembacaan absorbansi dilakukan dengan langkah yang sama seperti pada uji penghambatan pembentukan biofilm. Aktivitas antibiofilm dinyatakan sebagai persentase inhibisi biofilm yang dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Persentase Inhibisi Biofilm (\%)} = \frac{(\text{OD Kontrol} - \text{OD Sampel})}{(\text{OD Kontrol})} \times 100$$

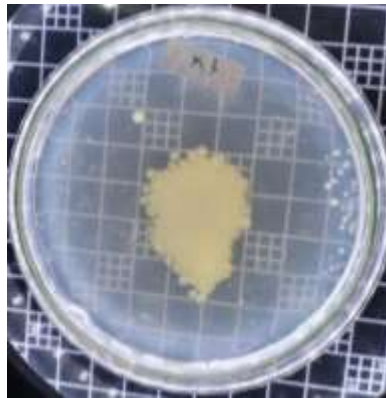
Analisis Data

Data zona hambat dianalisis secara deskriptif dan kuantitatif menggunakan rerata dan standar deviasi dari tiga kali uji ulang. Data dikategorikan berdasar kriteria Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): zona ≥ 10 mm dikategorikan aktif (Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol, 2009). Analisis statistik menggunakan uji ANOVA One Way untuk membandingkan efektivitas ekstrak terhadap aktivitas *S. aureus* dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$. Data didukung dokumentasi foto/hasil Gram.

Hasil dan pembahasan

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari B. hispida

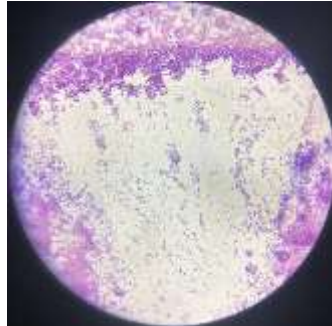
Isolasi bakteri endofit dari berbagai daun *B. hispida* yang tumbuh di Sulawesi Tenggara berhasil menghasilkan 1 isolat murni yang selanjutnya disebut EK (**Gambar 1**). Keberhasilan penelitian ini dalam mengisolasi dan mengidentifikasi awal bakteri endofit dengan tingkat kemurnian tinggi menunjukkan bahwa protokol sterilisasi permukaan yang digunakan (kombinasi etanol 70%, NaOCl 2%, dan aquades steril) (Ekajayanti Kining et al., 2025) sangat efektif untuk mengeliminasi mikroba epifit tanpa merusak viabilitas bakteri endofit internal. Uji sterilitas yang dilakukan pada bilasan akhir menunjukkan hasil negatif (tidak ada pertumbuhan koloni), mengkonfirmasi bahwa isolat yang diperoleh adalah endofit sejati. Pendekatan ini dapat dijadikan protokol standar untuk isolasi bakteri endofit dari tanaman obat tropis lainnya, mengingat efisiensi dan reproduibilitas metode yang tinggi. Penggunaan media Nutrient Agar sebagai media pertumbuhan umum memungkinkan isolasi bakteri endofit heterotroph dari berbagai kelompok taksonomi, meningkatkan peluang ditemukannya isolat dengan karakteristik bioaktif yang beragam.



Gambar 1. Isolat endofit daun *B. hispida* (EK)

Koloni EK menunjukkan bentuk irregular (tidak beraturan) dengan pertumbuhan yang menyebar. Ukuran koloni tergolong besar, mencakup area signifikan pada permukaan media, mengindikasikan pertumbuhan yang aktif dan kemampuan spreading yang baik. Koloni memiliki warna kuning pucat hingga krem (pale yellow to cream). Pigmentasi tampak homogen di seluruh permukaan koloni tanpa variasi warna yang mencolok, mengindikasikan produksi pigmen yang konsisten. Warna ini dapat mengindikasikan produksi karotenoid atau pigmen kuning lainnya yang umum pada bakteri tertentu. Elevasi koloni tampak convex (cembung) dengan permukaan yang relatif halus. Bagian tengah koloni terlihat sedikit lebih tebal dibandingkan tepi. Margin koloni bersifat undulate (bergelombang) hingga irregular (tidak beraturan). Tepi tidak berbatas tegas dan menunjukkan pola pertumbuhan yang menyebar keluar secara tidak uniform, yang merupakan karakteristik umum dari bakteri motil atau yang memiliki kemampuan swarming. Permukaan koloni tampak smooth (halus) dan glossy (mengkilap/berkilau), mengindikasikan produksi ekstraselular polysaccharide (EPS) atau lapisan lendir. Konsistensi kemungkinan mucoid (berlendir) atau butyrous (seperti mentega), yang umum pada bakteri penghasil eksopolisakarida. Isolat ini kemungkinan termasuk dalam genus seperti

Pseudomonas, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, atau *Bacillus* (beberapa spesies), yang umumnya menunjukkan pigmentasi kuning dan pola pertumbuhan spreading (Ramalingam, 2013).



Gambar 2. Hasil pewarnaan Gram Isolat EK (Pembesaran 100x)

Karakteristik morfologi mikroskopis Isolat EK hasil pewarnaan Gram yang diamati di bawah mikroskop (**Gambar 2**), menunjukkan sel bakteri tampak terwarnai ungu/violet yang mengindikasikan bakteri Gram-positif. Pewarnaan ungu yang intens menunjukkan struktur dinding sel dengan lapisan peptidoglikan tebal yang mampu menahan kompleks kristal violet-iodin selama proses dekolorisasi. Bentuk Sel (Cell Shape) Sel berbentuk basil (batang) dengan ukuran yang relatif besar dan panjang. Bentuk batang tampak jelas dengan ujung-ujung yang bulat (rounded ends), bukan runcing. Susunan Sel (Cell Arrangement) (Silhavy et al., 2010).

Sel-sel tersusun dalam berbagai pola: Single cells (sel tunggal) - terlihat di beberapa area, Diplobacilli (berpasangan) - sel-sel berpasangan end-to-end, Chain formation (rantai pendek) - beberapa sel membentuk rantai pendek yang terdiri dari 3-5 sel. Berdasarkan karakteristik mikroskopis yang teramati, isolat EK memiliki profil yang konsisten dengan kemungkinan genus *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp., dan *Lysinibacillus* spp (Silhavy et al., 2010).

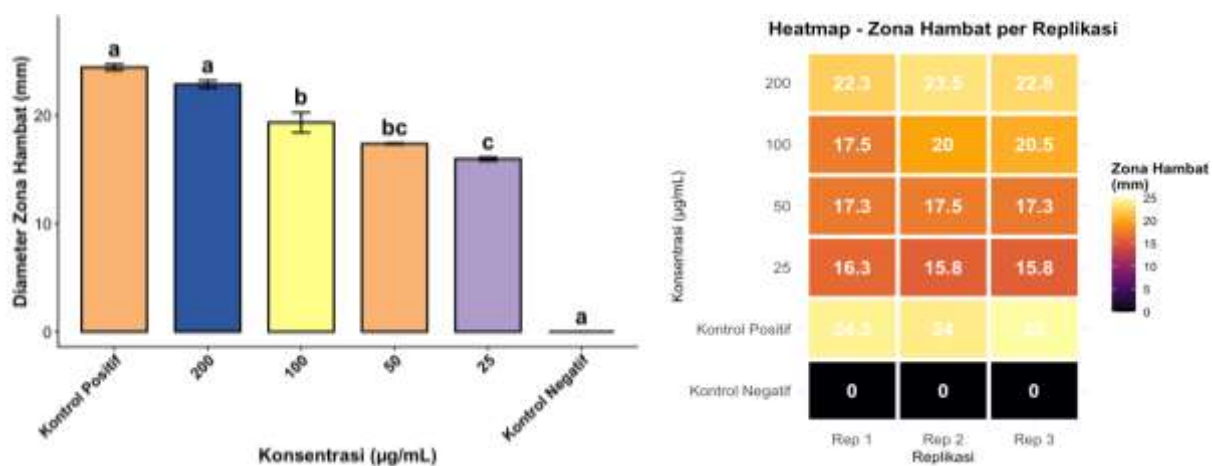
Hasil mikroskopis ini menguatkan interpretasi awal dari pengamatan koloni makroskopis. Karakteristik sebagai berikut kini lebih jelas: Koloni kuning-krem + Gram-positif basil, sangat konsisten dengan *Bacillus* spp. yang memproduksi pigmen karotenoid. Margin irregular dan spreading dapat dijelaskan oleh kemampuan swarming beberapa spesies *Bacillus*, dan permukaan glossy, produksi eksopolisakarida oleh *Bacillus*. Untuk memastikan dibutuhkan uji lanjut berupa pencitraan menggunakan Scanning Electron Microscopy (SEM) dan identifikasi molekular.

Aktivitas Antibakteri Isolat Endofit terhadap S. aureus

Evaluasi aktivitas antibakteri dari isolat EK dengan berbagai konsentrasi terhadap *S. aureus* menggunakan metode difusi cakram. Penggunaan metode difusi cakram dengan standardisasi inokulum menggunakan standar McFarland 0.5 ($\sim 10^8$ CFU/mL) dan inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam terbukti sangat efektif dalam menghasilkan data zona hambat yang konsisten dan reproduibel dengan tingkat presisi tinggi. Penggunaan tiga replikasi untuk setiap perlakuan meningkatkan reliabilitas data statistik dan memungkinkan perhitungan standar deviasi yang akurat (Tabel 1). Metode ini merupakan best practice yang direkomendasikan oleh Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) untuk uji sensitivitas antimikroba (Eisenberg et al., 2011; ASM, 2024). Penggunaan kontrol positif (antibiotik standar) dan kontrol negatif (pelarut) dalam setiap pengujian

meningkatkan validitas hasil secara signifikan dan memastikan bahwa aktivitas antibakteri benar-benar berasal dari metabolit bakteri endofit.

Semua konsentrasi menunjukkan aktivitas penghambatan dengan zona hambat yang kuat hingga sangat kuat (Davis dan Stout) . Isolat dengan aktivitas tertinggi menunjukkan zona hambat rata-rata sebesar $22,8 \pm 1,0$ mm pada konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$, diikuti dengan zona hambat $20,3 \pm 1,5$ mm pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$. Pada konsentrasi yang lebih rendah, isolat tetap menunjukkan aktivitas kuat dengan zona hambat $17,4 \pm 1,1$ mm pada konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$ dan $15,9 \pm 0,8$ mm pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$ (**Gambar 3**). Notasi huruf pada grafik (a, b, c) mengindikasikan hasil uji statistik, di mana perlakuan dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata secara statistik.



Gambar 3. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak bakteri endofit *B. hispida* terhadap *S. aureus*

Dengan demikian, isolat bakteri endofit dari *B. hispida* pada konsentrasi 100-200 $\mu\text{g/mL}$ dikategorikan memiliki aktivitas antibakteri sangat kuat yang setara dengan kontrol positif menggunakan antibiotik standar yang menunjukkan zona hambat sebesar $24,4 \pm 0,8$ mm (**Tabel 1**, **Gambar 2**). Temuan ini menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan beberapa penelitian sebelumnya. Isolat bakteri endofit dari tanaman teh (*Camellia sinensis*) menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dengan zona hambat berkisar antara 7,5-12,5 mm pada konsentrasi uji tunggal (Arum Sari et al., 2022). Penelitian oleh Steffany Poland's & Fitriani (2025) pada bakteri endofit dari akar *Clitoria ternatea* melaporkan zona hambat sebesar 6,75 mm terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 40 mg/mL.

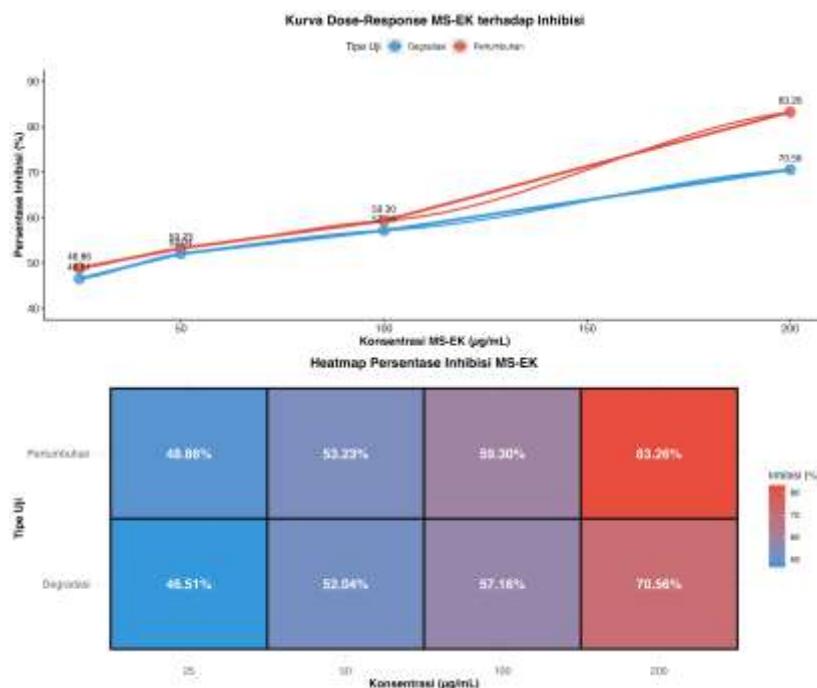
Perbedaan aktivitas antibakteri antara berbagai isolat endofit dapat dijelaskan oleh perbedaan jenis metabolit sekunder yang diproduksi, level ekspresi gen, dan kondisi lingkungan dalam jaringan tanaman inang. Penelitian terbaru oleh Nchabeleng et al. (2024) menggunakan transcriptomic profiling untuk menunjukkan bahwa kondisi metabolisme di dalam jaringan tanaman memicu upregulasi gen biosintesis metabolit antimikroba pada bakteri endofit tertentu. Hal ini memperkuat penjelasan mengapa bakteri endofit dari tanaman obat seperti *B. hispida* yang telah terbukti memiliki senyawa bioaktif, menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi. Pada konsentrasi 25-50 $\mu\text{g/mL}$, isolat menunjukkan aktivitas antibakteri kuat. Kontrol negatif (pelarut etil asetat tanpa ekstrak) menunjukkan hasil 0,0 mm, mengkonfirmasi bahwa aktivitas antibakteri benar-benar berasal dari metabolit yang diproduksi oleh bakteri endofit, bukan dari efek pelarut. Pola dosis-respons yang

jelas ditunjukkan oleh peningkatan zona hambat seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak, konsisten dengan model kinetika Michaelis-Menten untuk interaksi obat-target dalam mikrobiologi, menunjukkan mekanisme yang valid secara fisiologis.

Aktivitas antibakteri yang signifikan dari isolat-isolat tersebut dapat dijelaskan oleh kemampuan bakteri endofit untuk memproduksi berbagai senyawa bioaktif seperti peptida antimikroba, enzim litik, siderofora, dan metabolit sekunder lainnya yang dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* melalui mekanisme merusak dinding sel, gangguan sintesis protein, dan inhibisi replikasi DNA bakteri patogen (Nurdayani & Amirah, 2024; Sharma et al., 2014). Sensitivitas *S. aureus* terhadap ekstrak bakteri endofit *B. hispidia* menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang diproduksi oleh endofit memiliki afinitas tinggi terhadap target biologi dalam sel bakteri patogen tersebut. Pola dosis-respons yang menunjukkan aktivitas konsentrasi-dependen ini merupakan indikasi bahwa mekanisme penghambatan melibatkan interaksi spesifik antara metabolit dengan komponen sel bakteri target (Sanam et al., 2022)

Efek Ekstrak Bakteri Endofit Terhadap Pertumbuhan dan Degradasi Biofilm *S. aureus*

Metabolit sekunder bakteri endofit dari *B. hispidia* (MS-EK) menunjukkan kemampuan menghambat baik pertumbuhan maupun degradasi biofilm *S. aureus* secara konsentrasi-dependen. Pada uji pertumbuhan, persentase inhibisi meningkat seiring kenaikan konsentrasi: 48,86% (25 $\mu\text{g/mL}$), 53,01% (50 $\mu\text{g/mL}$), 59,30% (100 $\mu\text{g/mL}$), dan tertinggi 81,26% pada konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$. Pada uji degradasi biofilm juga terlihat pola serupa: 46,51% (25 $\mu\text{g/mL}$), 52,46% (50 $\mu\text{g/mL}$), 57,16% (100 $\mu\text{g/mL}$), dan 70,56% (200 $\mu\text{g/mL}$). Rerata absorbansi sampel selalu jauh lebih rendah daripada kontrol pada kedua uji, menandakan potensi anti-biofilm yang kuat dari ekstrak ini.



Gambar 4. Kurva Perbandingan Konsentrasi MS-EK terhadap Persentase Inhibisi

Inhibisi pertumbuhan biofilm hingga lebih dari 80% pada konsentrasi 200 µg/mL mencerminkan efektivitas ekstrak dalam menghambat adhesi dan proliferasi *S. aureus* di permukaan, sedangkan efek degradasi menunjukkan ekstrak juga mampu merusak matriks biofilm yang telah terbentuk. Efek konsentrasi-dependen yang jelas membuktikan ada hubungan antara jumlah senyawa bioaktif yang terkandung dengan potensi antibiofilm yang dihasilkan. Pola ini sejalan dengan temuan sebelumnya pada uji zona hambat, mengonfirmasi kemampuan bakteri endofit *B. hispida* menghasilkan metabolit sekunder antimikroba dan antibiofilm kuat.

Hasil penelitian ini didukung oleh studi-studi yang menunjukkan bahwa metabolit sekunder dari bakteri endofit mampu menghambat pembentukan dan merusak struktur biofilm patogen (Ekajayanti Kining et al., 2025), termasuk *S. aureus* (Nchabeleng et al., 2024; Sharma et al., 2014). Naveed et al. (2023) dan (Mamangkey et al., 2022.) juga melaporkan efek antibiofilm dari ekstrak *Bacillus* dan *Pseudomonas* endofit melalui mekanisme penghambatan quorum sensing serta destruksi molekul penyusun matriks biofilm. Temuan pada konsentrasi 100-200 µg/mL (inhibisi 59,30%-81,26%) menunjukkan ekstrak *B. hispida* telah memenuhi syarat sebagai kandidat antibiofilm alami yang unggul dalam riset antimikroba modern. Selain itu, penurunan absorbansi secara signifikan mendukung hipotesis bahwa metabolit bakteri endofit tidak hanya bekerja secara bakterisidal, tapi juga bakteriosidik terhadap komunitas biofilm multidrug-resistant.

Metode kuantifikasi absorbansi pada uji pertumbuhan dan degradasi biofilm, dengan tiga replikasi tiap konsentrasi dan kontrol yang tepat, memberikan data yang reliabel dan dapat dianalisis statistik dengan baik. Nilai perbedaan antara kontrol dan perlakuan ekstrak secara konsisten menunjukkan efisiensi metabolit endofit dalam menghambat dan merusak biofilm. Pola peningkatan inhibisi konsentrasi memperkuat pendekatan dosis-respons sebagai praktik terbaik untuk skrining antibiofilm.

Temuan ini mengonfirmasi bahwa eksplorasi bakteri endofit *B. hispida* dapat menjadi rujukan best practice bagi peneliti lain pada bidang anti-biofilm alami, dan dapat dipertimbangkan untuk pengembangan formula antibiofilm berbasis metabolit mikroba pada aplikasi medis dan kesehatan masyarakat.

Kesimpulan

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa isolasi dan identifikasi bakteri endofit daun *B. hispida* asal Sulawesi Tenggara berhasil menemukan isolat dengan kemampuan antibakteri dan antibiofilm yang sangat baik terhadap *S. aureus*. Dengan prosedur yang terstandarisasi, ekstrak bakteri endofit menunjukkan efektivitas dalam menekan pertumbuhan dan merusak biofilm hingga persentase yang tinggi pada konsentrasi optimal, serta menghasilkan zona hambat yang sebanding dengan kontrol positif. Temuan ini membuktikan bahwa bakteri endofit dari *B. hispida* dapat dimanfaatkan sebagai sumber alami antimikroba dan antibiofilm baru, berpotensi mendukung pengembangan strategi pengobatan untuk kasus infeksi *Staphylococcus aureus* yang resisten, serta memperkaya katalog sumber daya hayati Indonesia untuk aplikasi kesehatan di masa mendatang.

Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih dalam penelitian ini terutama ditujukan kepada pihak pemberi dana yaitu Dana DIPA Universitas Halu Oleo Tahun Anggaran 2025 berdasarkan SP DIPA-139.03.2.693377/2025 tanggal 2 Desember 2024 dan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Nomor: 2892/UN29.2.1/KU/2025 tanggal 1 Oktober 2025. Penulis juga menyampaikan apresiasi kepada

seluruh tim peneliti, mahasiswa, serta laboran Laboratorium Mikrobiologi FK UHO atas dukungan dan bantuan dalam pelaksanaan penelitian dan pengabdian. Semua kontribusi yang diberikan sangat berarti bagi kelancaran dan keberhasilan riset ini.

Daftar pustaka

- AHF Institute (2023) Retrived November 10, 2025, From Indonesia Interact website : <https://ahfinstitute.org/antimicrobial-resistance-resilience-to-tackle-a-global-challenge>
- Ahmed, S. K., Hussein, S., Qurbani, K., Ibrahim, R. H., Fareeq, A., Mahmood, K. A., & Mohamed, M. G. (2024). Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health*, 2, 100081. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.glmedi.2024.100081>
- Ali, A., & Rante, H. (2018). Screening Of Endophytic Bacteria Producing Antifungal Isolated From Indonesia Medicinal Plant, Java Ginseng (*Talinum Triangulare*) (Jacq.) Willd. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 10(6), 152. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2018v10i6.26037>
- Alim, N; Jasmiadi, J; Nadillah, N; Indrawaty K.I; Afira, N. (2024) Aphrodisiac Activity of Beligo (*B. hispida* (Thunb.) Cogn.) Seeds of Ethanol Extract in Mice. *Jurnal Kedokteran* 33(2), 75-79 <https://doi.org/10.21776/ub.jkb.2024.033.02.1>
- Arum Sari, S., Pujiyanto, S., & Supriyadi, A. (2022). Antibacterial Activity Tests of Endophytic Bacteria Isolates From Tea Plant (*Camellia sinensis*) Againts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. In *Berkala Bioteknologi*, 5(2).
- Beiranvand, M., Amin, M., Hashemi-Shahraki, A., Romani, B., Yaghoubi, S., & Sadeghi, P. (2017). Antimicrobial activity of endophytic bacterial populations isolated from medical plants of Iran. *Iranian journal of microbiology*, 9(1), 11–18.
- Chambers, H. F., & Deleo, F. R. (2009). Waves of resistance: *S. aureus* in the antibiotic era. *Nature reviews. Microbiology*, 7(9), 629–641. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>
- Ekajayanti Kining, Dian Firdiani, Sogandi, & Muh. Achyar Ardat. (2025). Molecular Identification of Endophytic Bacteria Isolated From *Allium cepa* L. Waste as Antibiofilm Agent Against *S.mutans*. *Jurnal Biodjati*, 10(1), 171–183. <https://doi.org/10.15575/biodjati.v10i1.44587>
- Gouda, S., Das, G., Sen, S. K., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2016). Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. In *Frontiers in Microbiology*, 7(9) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01538>
- Islam, M. T., Quispe, C., El-Kersh, D. M., Shill, M. C., Bhardwaj, K., Bhardwaj, P., Sharifi-Rad, J., Martorell, M., Hossain, R., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Butnariu, M., Rotariu, L. S., Suleria, H. A. R., Taheri, Y., Docea, A. O., Calina, D., & Cho, W. C. (2021). A Literature-Based Update on *B. hispida* (Thunb.) Cogn.: Traditional Uses, Nutraceutical, and Phytopharmacological Profiles. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 6349041. <https://doi.org/10.1155/2021/6349041>
- Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. (2009). www.atcc.org
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. In *Pathogens*, 10(2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Mamangkey, J., Mendes, L. W., Harahap, A., Briggs, D., & Kayacilar, C. (n.d.). Endophytic Bacteria and Fungi from Indonesian Medicinal Plants with Antibacterial, Pathogenic Antifungal and

- Extracellular Enzymes Activities: A Review. In International Journal of Science. <http://ijstm.inarah.co.id>
- Mohamad Darkazanli, Irina Kiseleva; New surface sterilization protocols for isolation of endophytic bacteria from plants (black turtle beans, peas, and barley). AIP Conf. Proc. 19 November 2021; 2388 (1): 040010. <https://doi.org/10.1063/5.0069149>
- Murdoch, D., O'Brien, K., Karron, R., Bhat, N., & Driscoll, A. (2012). Disk Diffusion Bioassays for the Detection of Antibiotic Activity in Body Fluids: Applications for the Pneumonia Etiology Research for Child Health Project. *Clinical Infectious Diseases*, 54(2), S159-S164. <https://doi.org/10.1093/cid/cir1061>
- Naveed, M., Ishfaq, H., Rehman, S. U., Javed, A., Waseem, M., Makhdoom, S. I., Aziz, T., Alharbi, M., Alshammari, A., & Alasmari, A. F. (2023). GC–MS profiling of *Bacillus* spp. metabolites with an in vitro biological activity assessment and computational analysis of their impact on epithelial glioblastoma cancer genes. *Frontiers in Chemistry*, 11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1287599>
- Nchabeleng, M. M., Fonkui, T. Y., & Ezekiel, G. (2024). The Indiscriminate Chemical Makeup of Secondary Metabolites Derived from Endophytes Harvested from *Aloe barbadensis* Miller in South Africa's Limpopo Region. *Molecules*, 29(6). <https://doi.org/10.3390/molecules29061297>
- Nurdayani, S., & Amirah, S. (2024). Antibacterial Activity of Endophytic Fungi from Bidara Roots Against Bacteria that Cause Skin Infections. In *Journal Microbiology Science*, 4(1).
- Osman, M. E., Abou-zeid, A. M., Abu-Saied, M. A., Ayid, M. M., & El-Zawawy, N. A. (2025). Diversity and bioprospecting activities of endophytic Fungi associated with different Egyptian medicinal plants. *Scientific Reports*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-01202-z>
- Pimentel, M. R., Molina, G., Dionísio, A. P., Maróstica Junior, M. R., & Pastore, G. M. (2011). The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnology research international*, 2011, 576286. <https://doi.org/10.4061/2011/576286>
- Pramono, H., Irawan, N. T., Firdaus, M. R. A., Sudarno, Sulmartiwi, L., & Mubarak, A. S. (2019). Bacterial endophytes from mangrove leaves with antibacterial and enzymatic activities. *Malaysian Journal of Microbiology*, 15(7), 543-553. <https://doi.org/10.21161/mjm.190352>
- Ramalingam, Bharathi (2013) The role of cell to cell interactions and quorum sensing in formation of biofilms in drinking water bacteria. PhD thesis, University of Sheffield.
- Sahu PK, Tilgam J, Mishra S, Hamid S, Gupta A, K J, et al. Surface sterilization for isolation of endophytes: Ensuring what (not) to grow. *J Basic Microbiol.* 2022; 62: 647–668. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100462>
- Sanam, M. U. E., Detha, A. I. R., & Rohi, N. K. (2022). Detection of antibacterial activity of lactic acid bacteria, isolated from Sumba mare's milk, against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 9(1), 53–58. <https://doi.org/10.5455/javar.2022.i568>
- Sharma, S., Verma, H. N., & Sharma, N. K. (2014). Cationic bioactive peptide from the seeds of *benincasa hispida*. *International Journal of Peptides*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/156060>
- Siddiqui AH, Koirala J. Methicillin-Resistant *S. aureus*. [Updated 2023 Apr 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482221/>

- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2(5), a000414–a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Singh, A., Singh, D. K., Kharwar, R. N., White, J. F., & Gond, S. K. (2021). Fungal Endophytes as Efficient Sources of Plant-Derived Bioactive Compounds and Their Prospective Applications in Natural Product Drug Discovery: Insights, Avenues, and Challenges. Microorganisms, 9(1), 197. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010197>
- Sirwan, K.A., Safin H, Karzan, Q., Radhwan, H.I, Abdulmalik F., Kochr, A.M, Mona, G.M., & Gamal, M. (2024). Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. Journal of Medicine, Surgery, and Public Health 2(2024)100081, 1-9
- Tahoangako, S. S., Santosa, D., & Fakhrudin, N. (2024). Study of the Utilization of Medicinal Plants by Traditional Healer of the Tolaki Ethnic Tribe, Southeast Sulawesi, Indonesia. Ethnobotany Research and Applications, 28. <https://doi.org/10.32859/era.28.39.1-17>
- Zhang D, Xu H, Gao J, Portieles R, Du L, Gao X, Borroto Nordelo C and Borrás-Hidalgo O (2021) Endophytic Bacillus altitudinis Strain Uses Different Novelty Molecular Pathways to Enhance Plant Growth. Front. Microbiol. 12:692313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.692313>