Isolasi, Identifikasi dan Aktivitas Antibakteri Bakteri Endofit Daun Pegagan

(*Centella asiatica* L.) terhadap *Escherichia coli*

Adityawarman¹; Mahyarudin²; Effiana²

¹ Program Studi Kedokteran, FK UNTAN

² Departemen Mikrobiologi, Program Studi Kedokteran, FK UNTAN

Abstrak

Latar Belakang. Di Indonesia diare masih merupakan masalah kesehatan masyarakat. Tanaman pegagan telah digunakan untuk pengobatan diare. Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman inang. Beberapa jenis bakteri endofit mampu menghasilkan senyawa aktif yang bersifat antibiotik. **Metode.** Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif-eksploratif. Isolasi bakteri endofit dari daun pegagan (*C.asiatica* L.) menggunakan metode tanam langsung, potensi antibakteri diuji dengan metode difusi cakram. Identifikasi bakteri endofit dilakukan dengan pengamatan morfologi koloni, morfologi sel dan uji biokimia. **Hasil.** Sebanyak 4 dari 42 isolat memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Isolat 16 memiliki kemampuan tertinggi yaitu dengan zona hambat 6,5 mm. isolat 16 memiliki kemiripan dengan genus *Pseudomonas*. **Kesimpulan.** Sebanyak 4 isolat bakteri endofit yang mempunyai potensi antibakteri terhadap *Escherichia coli*

Kata Kunci: *Centella asiatica* L., Bakteri endofit, *Escherichia coli*, zona hambat.

Background. Diarrhea in indonesia has become one of main health social problem. *Centella* has been used for the treatment of diarrhea. Endophytic bacteria are bacteria that live in the tissues of host plants. Several types of endophytic bacteria are known to produce active compounds that are antibiotics. **Method.** This research was a descriptive-explorative research. Isolation of endophyte bacteria from centella leaf (*C.asiatica* L.) was done by direct cropping method, a potency of antibacterial tested by disc diffusion method. Identification of endophytic bacteria was done by observation of colony morphology, cell morphology and biochemical test. **Result.** Total of 4 isolates from 42 isolates had antibacterial activity againts *E.coli*. the isolate 16 had highest antibacterial activity againts *E. Coli* with 6.5 mm inhibition zone, isolates 16 had similarities with the genus *Pseudomonas*. **Conclusion.** Four isolates of endophytic bacteria have antibacterial potency againts *E. coli*

Keywords: *Centella asiatica* L., Endophyte bacteria, *Escherichia coli*, inhibition zone.

PENDAHULUAN

Diare adalah buang air besar dengan feses yang berbentuk cair atau setengah cair, kandungan air pada feses lebih banyak dari biasanya yaitu lebih dari 200 gram atau 200 ml/24jam.¹ Di Indonesia diare masih merupakan masalah kesehatan masyarakat. Menurut data dari Kemenkes RI pada tahun 2015 telah terjadi kejadian luar biasa (KLB) di 11 provinsi dengan kasus sebanyak 1.213 penderita dengan angka kematian diare sebanyak 2,47%.² Provinsi Kalimantan Barat khususnya kota Pontianak pada tahun 2015, dilaporkan bahwa angka kejadian diare sebanyak 13.532 kasus dan masih termasuk 10 besar penyakit yang dilayani oleh puskesmas.³ Diare dapat disebabkan oleh bakteri, virus, parasit dan lain-lain. Di negara berkembang, prevalensi diare akut akibat bakteri dan parasit lebih tinggi dibandingkan akibat virus.⁴ Satu satu penyebab diare adalah *Escherichia coli*.¹

Escherichia coli merupakan bakteri normal yang ada di usus. Bakteri ini

merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk batang. *Escherichia coli* termasuk famili *Enterobacteriaceae* yang memiliki karakteristik tumbuh secara anaerob maupun fakultatif anaerob.⁵ Diare akut yang terjadi, umumnya karena tidak cukupnya ketersediaan air bersih dan higiene yang buruk.⁶ Pengobatan untuk diare akut adalah dengan rehidrasi cairan, diet, obat diare dan antibiotik.⁷ Antibiotik merupakan obat yang paling banyak digunakan pada infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Intensitas penggunaan antibiotik yang relatif tinggi menimbulkan berbagai permasalahan dan merupakan ancaman global bagi kesehatan terutama resistensi bakteri terhadap antibiotik.⁸ Untuk mengatasi infeksi mikroorganisme yang telah resisten terhadap antibiotik dapat menggunakan tanaman obat sebagai pengobatan alternatif.⁹ Satu diantara tanaman obat tradisional yang memiliki efek pengobatan yaitu tanaman pegagan.

Tanaman pegagan merupakan tanaman liar yang banyak tumbuh di

perkebunan, ladang, tepi jalan, pematangan sawah ataupun di ladang.¹⁰ Tanaman pegagan telah dilaporkan digunakan untuk pengobatan ulkus lambung, asma, epilepsi, hepatitis, sifilis dan diare.¹¹

Tanaman herbal ini sering digunakan oleh masyarakat baik dalam bentuk segar, kering maupun dalam bentuk ramuan (jamu). Tanaman ini mengandung berbagai bahan aktif seperti triterpenoid, saponin dan kandungan kimia dari pegagan terbagi menjadi beberapa golongan, yaitu asam amino, flavonoid, terpenoid dan minyak atsiri.¹² Flavonoid yang terkandung pada tanaman pegagan memiliki bioaktivitas sebagai antikanker, antivirus, antiperadangan dan antialergi.¹³ Fungsi lain dari pegagan antara lain sebagai obat penenang, obat penghilang sakit, *antidepressive* dan antimikroba.¹⁴ Hasil penelitian telah melaporkan bahwa ekstrak metanol dari tanaman pegagan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Shigella*

boydii, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*.¹⁵ Pada tanaman terdapat mikroorganisme yang dapat memproduksi metabolit sekunder dengan kemampuan sebagai antibakteri yang disebut bakteri endofit.¹⁶

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman inang tanpa menyebabkan gejala-gejala penyakit.¹⁷ Bakteri endofit hidup di dalam jaringan vaskular tumbuhan tanpa menyebabkan efek negatif. Hubungan simbiosis mutualisme antara bakteri dan tumbuhan memungkinkan bakteri menghasilkan senyawa bioaktif yang sama seperti terkandung di dalam tumbuhan inangnya.¹⁸ Mikroorganisme endofit dapat ditemukan pada berbagai jaringan diantaranya biji, ovula buah, batang, akar, umbi akar dan daun.^{19,20} Beberapa jenis bakteri endofit diketahui mampu menghasilkan senyawa aktif yang bersifat antibiotik.²¹

Beberapa bakteri endofit mampu menghasilkan produk potensial yaitu

Streptomyces griseus dari tanaman *Kandelia candel* menghasilkan asam p-aminoacetophenonic sebagai antimikroba.²² *Streptomyces* NRRL 30562 dari tanaman *Kennedia nigriscans* menghasilkan munumbicin (antibiotik) dan munumbicin D (antimalaria). *Serratia marcescens* dari tanaman *Rhyncholacis penicillata* menghasilkan oocydin A sebagai antifungal.²³ Bakteri Endofit yang diisolasi dari suatu tanaman dapat menghasilkan metabolit sekunder yang sama dengan tanaman aslinya.²⁴ Keuntungan lain yang diperoleh dari pengembangan bakteri endofit adalah dapat menjaga kelestarian tanaman obat, terutama jenis tanaman obat yang langka agar tidak digunakan secara terus menerus sehingga tidak menurunkan jumlah populasi.²⁵

Penelitian mengenai isolasi, identifikasi dan aktivitas bakteri endofit dari daun pegagan terhadap bakteri *E. coli* hingga saat ini belum pernah dilakukan. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka

peneliti bertujuan untuk melakukan penelitian mengenai isolasi, identifikasi dan aktivitas bakteri endofit dari daun pegagan (*C. asiatica* L.) terhadap *E. Coli*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antibakteri bakteri endofit dari daun pegagan (*C. asiatica* L.) terhadap bakteri *E. coli*.

METODE

Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, batang pengaduk pipet volume, mikropipet, plastik wrapping, erlenmeyer, penangas, ose, bunsen, *vortex mixer*, gelas objek, penjepit gelas objek, preparat, spidol, jangka sorong, pinset, korek api, *Laminar Air Flow Cabinet*, autoklaf, inkubator, neraca analitik, mikroskop cahaya, gelas beaker, lemari pendingin, gelas ukur, gunting bedah steril, pipet tetes dan hotplate.

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pegagan (*Centela asiatica* L.), biakan murni bakteri *Escherichia coli*, kantong plastik, kertas cakram, kertas timbang, plastik wrapping, tube mikropipet, spiritus, handscoon, Media *Nutrient Agar*, Media *Nutrient Broth*, Media *Mueller Hinton Agar*, aquades steril, alkohol 70%, larutan standar Mc Farland, minyak emersi, kristal violet, alkohol 96%, safranin, nistatin 30%, siprofloksasin, larutan NaOCL 1%, reagen tetrametil paraphenildiamin, media MIO (Motility Indole Ornitin), media SIM (sulfida indol motility), H₂O₂ 30%, media glukosa, media sukrosa, media laktosa, media maltosa, media sorbitol, media manitol, media inositol, media urea, media O-F 0,5-1% karbohidrat, media *Simmons Citrat Agar*, media TSIA, NaCL steril larutan H₂SO₄ 1% dan larutan (BaCl₂.2H₂O) 1,175%.

Pengambilan Daun Pegagan

Sampel daun yang sehat diperoleh di jalan Khatulistiwa Kecamatan Pontianak timur Kota Pontianak. Sampel yang terkumpul dibawa ke Laboratorium Mikroskopik di Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura kota pontianak.

Determinasi

Determinasi tanaman pegagan dilakukan di Laboratorium Biologi fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Tanjungpura kota Pontianak provinsi Kalimantan Barat.

Sterilisasi Permukaan Daun

Daun pegagan dicuci menggunakan air, kemudian permukaan daun disterilisasi secara bertahap dengan cara merendam di alkohol 70% selama 1 menit, kemudian direndam di dalam larutan 1% sodium hypochlorite (NaOCl) selama 5 menit, diikuti dengan merendam di alkohol 70 % selama 1 menit. Pada tahap akhir sterilisasi daun, sampel dibilas 3 kali dengan aquades steril.

Konfirmasi Keberhasilan

Aquades steril pada bilasan terakhir diambil sebanyak 100µL dan diisolasikan pada media NA dengan menggunakan metode cawan sebar. Jika ditemukan pertumbuhan bakteri pada media, maka bakteri hasil isolasi bukanlah bakteri endofit. Sedangkan pada media NA yang tidak ditumbuhi bakteri, maka bakteri yang tumbuh hasil isolasi awal tersebut adalah bakteri endofit.

Isolasi, Pemurnian dan Subkultur Bakteri Endofit

Daun yang telah disterilisasi kemudian dikeringkan di atas kertas saring steril. Daun dipotong dengan menggunakan pisau bedah steril di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) dan daun dipotong-potong menjadi beberapa bagian dengan menggunakan prosedur aseptik. Bagian dari daun tersebut diinokulasikan pada media nutrisi agar (NA) kemudian ditambahkan dengan agen antijamur yaitu nistatin pada konsentrasi 30 µg/mL. Setiap cawan petri berisi tiga

atau empat potongan daun. Cawan petri yang berisi sampel daun disegel menggunakan pita paraffin dan diinkubasi pada 37°C selama 24-48 jam.

Bakteri yang tumbuh pada media NA setelah 24-48 jam disubkultur pada media agar nutrisi dengan metode cawan gores (*streak plate method*). Semua isolat bakteri endofit yang tumbuh dilakukan pemurnian dan peremajaan isolat berdasarkan morfologi koloni. Setiap isolat bakteri endofit dibuat dua pada media agar miring, masing-masing dipergunakan sebagai *working culture* dan *stock culture*.

Peremajaan dan Konfirmasi Bakteri Uji

Satu koloni bakteri *E. Coli* diinokulasikan pada media NA dengan metode cawan gores (*streak plate method*), setelah itu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Peremajaan ini dilakukan karena dalam pengujian aktivitas antibakteri diperlukan koloni bakteri segar yang berusia 24 jam.⁷¹

Pembuatan Larutan Mc Farland

Pembuatan larutan Mc Farland dilakukan dengan cara mencampurkan 0,05 ml barium klorida 1,175% ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dan 9,95 ml asam sulfat 1% (H_2SO_4).

Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan secara aseptis dengan cara koloni bakteri uji pada media peremajaan yang berumur 24 jam diambil dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 mL larutan NaCl steril 0,9%. Kekeruhan yang diperoleh kemudian disetarakan dengan standar Mc farland 0,5% yaitu setara dengan jumlah pertumbuhan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL.

Kontrol Positif dan Negatif

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah siprofloksasin. Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquades

Uji Sensitivitas Antibiotik

Suspensi bakteri uji diambil 200 μL dan diratakan pada permukaan media Mueller Hinton Agar (MHA). Permukaan media diberi kertas cakram 4 buah dan kertas cakram tersebut ditetesi suspensi isolat bakteri endofit kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening pada daerah sekitar antibiotik menunjukkan adanya sensitivitas terhadap bakteri uji.

Produksi Metabolit Antibakteri dari Bakteri Endofit

Produksi metabolit antibakteri dilakukan dengan metode isolat bakteri endofit yang tumbuh pada medium NA diinokulasikan pada media NB yang bertujuan untuk memproduksi metabolit antibakteri dari bakteri endofit. Isolat bakteri endofit diambil menggunakan jarum ose dan diinokulasikan kedalam tabung tabung reaksi 10 mL yang berisi media cair NB. Tabung reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 hari dalam kondisi stasioner kemudian

homogenisasi menggunakan vortex. Kemudian isolat diuji dengan metode difusi cakram untuk uji terhadap bakteri patogen.

Skrining Bakteri Endofit Potensial

Biakan murni bakteri endofit yang diperoleh diuji potensi antibakterinya terhadap *E. coli* dengan metode *Paper Disc Agar Diffusion Technique*. Suspensi bakteri uji yang telah diukur kepadatannya kemudian disebar di permukaan media MHA dengan metode *swab*. Sebanyak 20 µL suspensi bakteri endofit hasil homogenisasi diserapkan pada cakram steril berdiameter 6 mm. Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati ada atau tidaknya zona bening yang terbentuk.

Pengukuran Zona Hambat

Zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram kertas saring diukur menggunakan jangka sorong.

Bakteri murni yang memiliki efek aktivitas antibakteri tertinggi kemudian

dikarakterisasi dan diidentifikasi yang dilakukan secara biokimia dengan mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. karakterisasi yang dilakukan meliputi pengamatan morfologi koloni, morfologi sel dan biokimia bakteri

HASIL

Determinasi Tumbuhan

Hasil Determinasi tumbuhan Pegagan dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Tanjungpura Kota Pontianak. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tumbuhan yang digunakan adalah tumbuhan dari famili *Apiaceae* dengan nama spesies *Centella asiatica* L. genus *Centella*.

Sterilisasi

Hasil sterilisasi permukaan daun pegagan yaitu terdapat adanya pertumbuhan bakteri di sekitar daun pada petri yang berisi daun dan tidak adanya

pertumbuhan bakteri pada cawan petri konfirmasi keberhasilan sterilisasi daun.

Isolasi Bakteri Endofit

Telah diperoleh hasil pemurnian isolat bakteri endofit daun pegagan yang berjumlah 42 isolat murni.

Hasil Konfirmasi Bakteri Uji

Hasil konfirmasi bakteri uji pada media NA menunjukkan koloni berwarna putih kekuningan, sirkular dan tepian utuh. Hasil konfirmasi bakteri uji dilanjutkan dengan metode pewarnaan gram. bakteri tersebut merupakan gram negatif, berwarna merah dan berbentuk batang. Pada media EMBA (Eosin Methylene Blue Agar) didapatkan pertumbuhan koloni berbentuk bulat dan berwarna hijau metalik.

Hasil Uji Aktivitas

. Hasil pengujian aktivitas bakteri endofit daun pegagan terhadap *E. coli* didapatkan sebanyak 4 isolat bakteri endofit dari 42 isolat memiliki aktivitas terhadap *E. coli*. Aktivitas isolat bakteri endofit berkisar antara 2 mm – 6,5 mm (aktivitas lemah-sedang) sedangkan

kontrol positif sensitif terhadap bakteri *E. coli*.

Hasil Identifikasi Isolat

Isolat bakteri endofit yang memiliki zona hambat terbesar yaitu isolat nomor 16. Isolat bakteri endofit paling potensial yang berhasil di isolasi dari daun pegagan memiliki karakter morfologi sel berbentuk bulat dan termasuk kedalam golongan bakteri gram negatif.

Uji biokimia bakteri endofit dilakukan di ULK (Unit Laboratorium Kesehatan) Dinas Kesehatan Provinsi. Hasil uji biokimia isolat bakteri endofit yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *E. coli* yang paling potensial menunjukkan bahwa isolat bakteri endofit nomor 16 merupakan bakteri fakultatif anaerob, bakteri tidak motil, fermentasi karbohidrat negatif, indol negatif, H₂S negatif, urease negatif, simon sitrat negatif, katalase positif dan fermentatif glukosa OF

Hasil identifikasi isolat bakteri endofit mengacu pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Bakteri endofit memiliki kemiripan karakteristik morfologi sel dan biokimia yang sama dengan genus *Pseudomonas*

PEMBAHASAN

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup dalam jaringan tanaman yang dapat diisolasi melalui sterilisasi permukaan jaringan.²⁶ Jumlah bakteri endofit di dalam tanaman tidak dapat ditentukan secara pasti, namun bakteri ini dapat dideteksi dengan mengisolasi pada media agar.²⁷ Penggunaan media NA lebih cocok untuk isolasi bakteri endofit dan ditambahkan nistatin sebagai antifungi.^{28,29} Bakteri endofit yang tumbuh pada media NA yang secara makroskopis berbeda dianggap merupakan isolat yang berbeda, namun jika koloni bakteri endofit yang tumbuh di media pertumbuhan yang secara makroskopis sama dianggap isolat yang

sama. Bakteri endofit yang berbeda kemudian dilakukan pemurnian. Dari hasil setiap bakteri yang dimurnikan didapatkan 42 isolat bakteri endofit. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sari didapatkan 3 isolat aktinomiset endofit dari daun pegagan sebagai antihipertensi.³⁰

Sebanyak 4 dari 42 isolat Isolat bakteri endofit memberikan efek zona hambat/bening terhadap bakteri *Escherichia coli*. Berdasarkan tabel 4.2 terdapat 4 isolat aktif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji. Masing masing isolat memiliki zona hambat, isolat 16 memiliki zona hambat sebesar 6,5 mm, isolat 36 memiliki zona hambat sebesar 4,5 mm, isolat 26 dan 30 memiliki zona hambat sebesar 2 mm. hal ini menunjukkan bahwa bakteri endofit dari daun pegagan mampu menghasilkan metabolit sekunder sebagai antibakteri dikarenakan bakteri endofit tersebut memiliki metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya.³¹ Terdapat 38 isolat yang tidak menghasilkan zona

hambat pada isolat bakteri endofit nomor 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41 dan 42. Sedangkan kontrol positif pada penelitian memiliki zona hambat sebesar 39 mm. Terbentuknya zona hambat juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan bakteri uji yang berlebihan.³² Semakin tinggi konsentrasi antibakteri yang dihasilkan maka semakin tinggi pula daya hambatnya yang ditunjukkan oleh kecilnya pertumbuhan koloni bakteri patogen.³³

Setiap tanaman dapat mengandung beberapa bakteri endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang di duga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik dari tanaman inangnya kedalam bakteri endofit.³⁴

Identifikasi bakteri endofit dilakukan berdasarkan hasil morfologi koloni dan morfologi sel serta aktivitas biokimia. Identifikasi mengacu pada pada *Bergey's Manual of Determinative*

Bacteriology. Berdasarkan buku *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology* bakteri yang memiliki potensi sebagai antibakteri tersebut merupakan bakteri genus *Pseudomonas* dikarenakan memiliki karakteristik morfologi sel dan morfologi sel yang sama serta aktivitas biokimia yang sama.

Pseudomonas dapat ditemukan di tanah, air, tumbuh tumbuhan dan manusia. Dari beberapa penelitian ditemukan adanya bakteri endofit *Pseudomonas* sp endofit dari tanaman yang memiliki efek baik yaitu senyawa metabolit *Pseudomonas* sp endofit dari jagung mampu menghambat *Fusarium* sp.³⁵ kemudian 2 isolat bakteri endofit dari tanaman dahlia yaitu *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC44 dan *Pseudomonas cepacia* LBKURCC47 yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.³⁶

Hasil Uji fitokimia yang telah dilakukan oleh Halim, menunjukan bahwa *Pseudomonas* sp. positif mengandung

saponin dan terpenoid.³⁷ Saponin merupakan senyawa glikosilat yang terdapat dalam sel tanaman sebagai prekursor tidak aktif tetapi siap diubah menjadi senyawa bioaktif antibiotik oleh enzim apabila diserang oleh patogen.³⁸ Mekanisme terpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin.³⁹

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat 16 memiliki kemiripan dengan genus *Pseudomonas* dan Isolat 16 memiliki aktivitas zona hambat yang paling tinggi dengan membentuk zona hambat sebesar 6,5 mm serta Siprofloksasin yang digunakan sensitif terhadap bakteri *Escherichia coli*

dengan membentuk zona hambat sebesar 39 mm

DAFTAR PUSTAKA

1. Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Longo DL, Loscaizo J, et al. Harrison's Internal Medicine. 19th Edition. USA. McGraw – Hill; 2015.
2. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI) Profil data kesehatan Indonesia tahun 2015. Jakarta: Kementrian Kesehatan RI; 2016.
3. Profil Dinas Kesehatan Kota Pontianak. Kasus Diare, Seksi Pengendalian Penyakit, Dinas Kesehatan Kota Pontianak. Pontianak; 2015.
4. Farthing M, Lindberg G, Dite P, Khelif I, Lindo ES, Ramakrishna BS, et al. Acute diarrhea. World Gastroenterology Organisation Practice Guideline.2012[cited 2016 Des 23]. Available From : <http://www.worldgastroenterology.org>.
5. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 27th ed. USA: The McGraw-Hill; 2016.
6. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin Microbiol Rev. 2005;18:465-83.
7. Kitaoka M, Miyata ST, Unterweger D, Pukatzki S. Antibiotic resistance mechanisms of *vibrio cholerae*. J of Med Microbiol. 2011;60(4):297-407.
8. Permenkes RI. Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik, Kementrian Kesehatan RI. Jakarta; 2011.
9. Akbar M, Budiarti LY, Edyson. Perbandingan efektivitas antibakteri antara ekstrak metanol kulit batang kasturi dengan ampicilin terhadap *Staphylococcus aureus* in Vitro. Jurnal Berkala Kedokteran, 2016;12(1): 1-9.
10. Lusiana, Dhafir F, Masrianih. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*centella asiatica*) terhadap Mortalitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) Galur Ddy. E-jipbiol, 2013;2:24-29.
11. Brinkhaus B, Lindner M, Schuppan D, Hahn EG. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. Phytomedicine. Erlangen-Nuremberg. 2000;7(5):427-488.
12. Dalimartha, S. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Jilid 2. Jakarta: Trubus Agriwidya; 2008.(cited 2016 Des 23)Availablefrom: <https://books.Google.co.id/books?id=vmrbQE4jfYcC&printsec=fr>

- ontcove&hl=id&source=gbs_ ge _summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.
13. Sundaryono, A. Penggunaan batang tanaman betadin (*Jatropha multifida* L.) untuk meningkatkan jumlah Trombosit pada *Mus Musculus*. Artikel asli Media Medika Indoesiana. 2011;45(2):1-5.
 14. Brinkhaus B, Lindner M, Schuppan D, Hahn EG. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. Phytomedicine. Erlangen-Nuremberg. 2000;7(5):427-488.
 15. Panthi,MP, Chaudhary,RP Antibacterial activity of some selected folklore medicinal plants from West Nepal. Scientific world. 2006;4(4):16-21.
 16. Pratiwi BE. Isolasi dan skrining fitokimia Bakteri Endofit dari daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Yang Berpotensi Sebagai Antibakteri [skripsi]. Jakarta. UIN; 2015.
 17. Bhore SJ, Sathisha G. Screening of endophytic colonizing bacteria for cytokinin-like compounds: crude cell-free broth of endophytic colonizing bacteria is unsuitable in cucumber cotyledon bioassay. World J. Agric. Sci. 2010;6(4):345-352.
 18. Barbara JES, Christine JCB. 2006. What are Endophytes. In Microbial Root Endophytes (Eds: Thomas N. Sieber). Springer-Verlag, Berlin.
 19. Altafi, AD. Plasmid profiles, antibiotic and heavy metal resistance incidence of endophytic bacteria isolated from grapevine (*Vitis vinifera* L.), African J. of Biotech. 2009;8(21):5873-5882.
 20. Vega FE, Ripoll M, Posada F, Buyer JS. Endophytic bacteria in *Coffea Arabica* L. J. Basic. Microbiol, 2005;45:371-380.
 21. Castillo U, et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp.NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. FEMS Microbiology Letters. 2003;224:180-190.
 22. Guan SH, Sattler I, Lin WH, Guo DA, Grabley S. p-Aminoacetophenonic acids produced by a mangrove endophyte: *Streptomyces griseus* subspecies. J Nat Prod. 2005;68:1198–200.
 23. Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications Mini Review. FEMS Microbiol Lett. 2008;(278):1–9.
 24. Nursulistiyarini F. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit Penghasil Antibakteri dari daun Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) steenis) [Skripsi]. Yogyakarta: Universitas Negeri Sunan Kalijaga; 2014.
 25. Besung, INK. Pegagan (*Centella asiatica*) sebagai alternative Pencegahan Infeksi pada ternak. Buletin veteriner udayana. 2009;61-67:2.
 26. Toy TSS, Lampus BS, Hutagalung BSP. Uji Daya Hambat Ekstrak Rumput Laut Gracilaria Sp Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus Aureus*. E-GigI. 2015;3(1):1-7.
 27. Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW.. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can J Microbiol. 1997; 43:895-914
 28. Bacon CW, Hinton DM.. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. Di dalam: Gnanamanickam SS, editor, Plant- Associated Bacteria. Netherland : Springer. 2006
 29. Sulistiyani TR. Keragaman bakteri endofit tanaman kunyit putih (*Curcuma zedoaria*) dan toksisitasnya terhadap embrio ikan zebra. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor. 2014
 30. Kumala S, Siswanto EB. Isolation and screening of endophytic microbes from *Morinda citrifolia* and their ability to produce antimicrobial substances. Microbiology Indonesia. 2007;1: 145-148
 31. Sari WE. Aktivitas antihipertensi aktinomiset endofit asal tanaman pegagan dan belimbing wuluh [skripsi]. Bogor (ID): Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, 2011.
 32. Radji, M. Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. Pharmaceutical Sciences and Research, 2012; 2(3):113-126
 33. Strobel, GA. Microbial gifts from rain forests. Canadian Journal of Plant Pathology, 2002; 24(1):4-20.
 34. Sunariasih, Linda NP, Suada IK, Suniti NW. Identifikasi jamur endofit dari biji padi dan uji daya hambatnya terhadap *Pyricularia oryzae* Cav. Denpasar. E-jurnal agroteknologi tropika 2014;3(2).
 35. Tan RX, Zou WX.. Endophytes: a rich source of functional metabolites. Nat Prod Rep; 2001;18: 4483459
 36. Hanif, Andini, Bonny P, Wahyu S, Munif A. Seleksi Bakteri Endofit Penghasil Senyawa Metabolit untuk Pengendalian Cendawan Patogen Terbawa Benih Jagung. Jurnal Fitopatologi Indonesia. 2017;12(5)149
 37. Elita A, Saryono S, Jose C. Penentuan waktu optimum produksi antimikroba dan uji fitokimia ekstrak kasar fermentasi bakteri endofit *Pseudomonas* sp. dari umbi tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*). Jurnal Indonesian Chemia Acta, 2013;3(2):56-62.
 38. Halim, Jasril, Saryono. Optimalisasi produksi senyawa metabolit sekunder dari

- pseudomonas sp. Endofit tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*). Jurnal indonesian chemia acta, 2014, 5.1: 8-14.
39. Turk FM. Saponins versus plant fungal pathogens, Journal of Cell and Molecular Biology. 2006; **5**:13-17.