

## Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dan Uji Aktivitas Antibakterinya terhadap Bakteri Penyebab Penyakit Kulit *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*

Anggistina Wulansari<sup>1)</sup>, Maulida Aqlinia<sup>1)</sup>, Wijanarka<sup>1\*)</sup> dan Budi Raharjo<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro  
Jl. Prof. H. Soedharto, SH Tembalang, Semarang, Indonesia  
[anggistinaw@gmail.com](mailto:anggistinaw@gmail.com)<sup>1)</sup>, [wijanarka1810@gmail.com](mailto:wijanarka1810@gmail.com)<sup>1\*)</sup>

### ABSTRAK

Data Profil Kesehatan Indonesia 2010 menunjukkan bahwa penyakit kulit menjadi peringkat ketiga dari 10 penyakit terbanyak pada pasien rawat jalan di rumah sakit se-Indonesia. *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan salah satu bakteri patogen yang dapat menyebabkan penyakit kulit. Tanaman bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) merupakan salah satu tanaman obat tradisional yang banyak digunakan untuk mengobati penyakit kulit dan memiliki efek samping yang lebih aman daripada obat kimia. Bakteri endofit mampu menghasilkan senyawa bioaktif bersifat antibakteri yang sama dengan tanaman inangnya, maka tidak perlu menebang tanaman aslinya untuk diambil sebagai simplisia. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengisolasi bakteri endofit dari tanaman bangle dan mengetahui aktivitas antibakterinya dalam menghambat pertumbuhan bakteri penyebab penyakit kulit *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi agar menggunakan *paperdisk*. Hasil isolasi diperoleh 16 isolat bakteri dari bagian rimpang, akar, batang dan daun. Hasil skrining diperoleh 3 isolat bakteri endofit yang potensial yaitu isolat Da\_2 dari bagian daun, Ba\_2 dari bagian batang dan Ri\_2 dari bagian rimpang. Aktivitas antibakteri supernatan isolat Ba\_2 menunjukkan efek yang paling baik dibandingkan dengan supernatan isolat Da\_2 dan Ri\_2. Diameter zona hambat terbesar pada isolat Ba\_2 terhadap bakteri uji *S. epidermidis* sebesar 26 mm yang dapat dikategorikan sangat kuat sedangkan pada isolat bakteri endofit Ba\_2 terhadap *P. aeruginosa* sebesar 13,99 mm yang dikategorikan kuat.

**Kata kunci:** Antibakteri, Dermatitis, Endofit, *Zingiber cassumunar*

### ABSTRACT

Data from the Indonesian Health Profile 2010 showed that skin disease was ranked third of the 10 most common diseases in outpatients in hospitals Indonesia. *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* are pathogenic bacteria that can cause skin diseases. The bangle plant (*Zingiber cassumunar* Roxb.) is one of the traditional medicinal plants that is widely used to treat skin diseases and has side effects that are safer than chemical drugs. Endophytic bacteria can produce the same antibacterial bioactive compounds as their host plants, so there is no need to cut down the original plants to be taken as simplicia. The purpose of this study was to isolate endophytic bacteria from bangle plants and find out their antibacterial activity in inhibiting the growth of bacterial causes of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The method used to test antibacterial activity is the diffusion method to use *paperdisk*. The isolation results obtained 16 bacterial isolates from the rhizomes, roots, stems and leaves. The screening results obtained 3 potential endophytic bacterial isolates namely Da\_2 isolates from the leaf part, Ba\_2 from the stem part and Ri\_2 from the rhizome part. The antibacterial activity of supernatant Ba\_2 isolates showed the best effect compared to the supernatant of Da\_2 and Ri\_2 isolates. The diameter of the largest inhibition zone in the Ba\_2 isolate against *S. epidermidis* of 26 mm which can be categorized very strongly where as in isolates of endophytic bacteria Ba\_2 against *P. aeruginosa* of 13,99 mm which is categorized as strong.

**Keywords:** Antibacteri, Dermatitis, Endophyte, *Zingiber cassumunar*

## 1. Pendahuluan

Data Profil Kesehatan Indonesia 2010 yang menunjukkan bahwa penyakit kulit menjadi peringkat ketiga dari 10 penyakit terbanyak pada pasien rawat jalan di rumah sakit se-Indonesia berdasarkan jumlah kunjungan yaitu sebanyak 192.414 kunjungan dan 122.076 kunjungan diantaranya merupakan kasus baru (Kemenkes, 2011 dalam Oktaviani, 2016).

Salah satu bakteri penyebab penyakit kulit yaitu *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Staphylococcus epidermidis* merupakan salah satu spesies dari genus bakteri *Staphylococcus* yang paling sering ditemui dalam kepentingan klinis. Bakteri ini adalah bakteri Gram positif dan termasuk *Staphylococcus* dengan koagulasi negatif. Sebagian besar bakteri ini adalah flora normal pada kulit dan membran mukosa manusia. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk basil. *P. aeruginosa* merupakan bakteri oportunistik yang memanfaatkan kerusakan pada mekanisme pertahanan inang untuk memulai suatu infeksi. Infeksi *P. aeruginosa* menjadi masalah yang serius pada pasien rumah sakit yang menderita kanker, fibrosis kistik dan luka bakar (Jawetz, 2010).

Infeksi dermatitis akibat bakteri dapat disembuhkan dengan pemberian antibiotik. Namun pemakaian antibiotik, khususnya bila digunakan tanpa aturan yang jelas dan secara berlebihan bisa menimbulkan tingginya prevalensi resistensi (Yenny dan Herwana, 2007). Resistensi antibiotik menyebabkan penyakit infeksi semakin sulit untuk disembuhkan sehingga banyak kerugian yang dialami dan masyarakat mulai beralih menggunakan obat-obatan alami berbahan dasar tanaman obat (*Back to Nature*).

Tanaman obat telah digunakan sejak lama untuk mengobati berbagai penyakit. Hal ini disebabkan adanya metabolit sekunder seperti tanin, alkaloid, terpenoid, kuinon, flavonoid dan polifenol. Agen antimikroba dari tanaman diyakini memiliki lebih sedikit efek samping dibandingkan dengan antimikroba

sintetis. Dengan demikian, berbagai penelitian telah ditunjukkan pada tanaman untuk menemukan agen antimikroba (Sulaiman, *et al.*, 2016).

Salah satunya tanaman obat adalah tanaman bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb). Tanaman bangle mengandung senyawa golongan flavonoid, kuinon, steroid dan triterpenoid. Senyawa golongan flavonoid diketahui mempunyai aktivitas yang bermanfaat sebagai antiseptik dan antibakteri karena kandungannya yang cukup banyak dalam rimpang bangle (*Z. cassumunar* Roxb.) (Tirtaningrum, 2014).

Penggunaan tanaman secara terus-menerus untuk dijadikan obat dapat menimbulkan eksploitasi sehingga menuntut penemuan dan pengembangan obat antibakteri baru dengan memanfaatkan bakteri endofit dari tanaman obat (Purwanto *et al.*, 2014). Bakteri endofit merupakan bakteri yang dapat hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan bahaya terhadap tanaman inangnya. (Ryan *et al.*, 2008). Bakteri endofit mampu menghasilkan senyawa bioaktif bersifat antibakteri yang sama dengan tanaman inangnya, maka tidak perlu menebang tanaman aslinya untuk diambil sebagai simplisia, yang kemungkinan besar memerlukan puluhan tahun untuk dapat dipanen (Kusumawati *et al.*, 2014).

Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi bakteri endofit dari tanaman bangle dan mengetahui aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Penelitian aktivitas antibakteri ini dilakukan dengan metode difusi cakram menggunakan *paperdisk*.

## 2. Metode

### 2.1 Isolasi dan Pemurnian Bakteri Endofit Tanaman *Z. cassumunar* Roxb.

Isolasi bakteri endofit dilakukan menurut Pujiyanto *et al.* (2012). Sampel akar, rimpang, batang dan daun bangle dicuci dengan air mengalir hingga bersih dan dipotong kecil-kecil. Sterilisasi permukaan dilakukan dengan merendam sampel akar, rimpang, batang dan daun bangle secara berturut-turut dalam alkohol

70% selama 1 menit, natrium hipoklorit 5,25% selama 3 menit, dan dibilas dengan *Aquadest* steril selama 3 kali. Sampel akar, rimpang, batang dan daun bangle yang sudah disterilisasi permukaan diletakkan di atas cawan petri steril dan dikeringanginkan. *Aquadest* dari bilasan terakhir digunakan sebagai kontrol yang diinokulasikan ke dalam medium NA pada cawan petri yang berbeda untuk konfirmasi keberhasilan sterilisasi permukaan.

Masing-masing akar, rimpang, batang dan daun bangle digerus kasar secara aseptik menggunakan mortar kemudian diletakkan pada cawan petri berisi medium NA dengan penambahan nistatin 0,01% (b/v). Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni bakteri yang tumbuh diisolasi dan dimurnikan menggunakan medium NA.

Koloni yang tumbuh di sekitar jaringan tanaman diamati warna, bentuk, dan ukurannya. Isolat bakteri endofit yang tumbuh dan memiliki koloni berbeda diambil dari bagian terdekat dengan jaringan tanaman lalu dipindahkan ke medium NA pada cawan petri baru beberapa kali hingga koloni bakteri benar-benar terpisah dan murni satu bakteri. Isolat bakteri endofit dijadikan stok kultur murni pada medium NA miring dalam tabung reaksi pada suhu 4°C.

## 2.2 Karakterisasi morfologi bakteri endofit tanaman *Z. cassumunar* Roxb.

Karakterisasi morfologi bakteri endofit dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Karakterisasi morfologi bakteri endofit dilakukan dengan menginokulasikan bakteri endofit pada cawan petri berisi medium NA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Karakterisasi morfologi makroskopis dilakukan dengan mengamati koloni bakteri yang tumbuh di atas permukaan medium agar seperti bentuk, warna, ukuran, dan tepian koloni. Karakterisasi morfologi mikroskopis dilakukan dengan serangkaian metode pewarnaan Gram sel bakteri lalu diamati di bawah mikroskop. Warna dinding sel dan morfologi sel diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x.

## 2.3 Skrining Bakteri Endofit Penghasil Antibakteri dengan Uji Aktivitas Antibakteri

Pembuatan suspensi bakteri endofit tanaman bangle dan bakteri uji dilakukan secara aseptis dengan cara masing-masing bakteri pada medium peremajaan yang berumur 24 jam diambil dengan menggunakan jarum ose lalu disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 mL larutan NaCl steril 0,9%. Kekeruhan yang diperoleh kemudian disetarakan dengan standar McFarland 0,5 yaitu setara dengan jumlah pertumbuhan  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL. Uji daya hambat bakteri dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan *paperdisk*. Sebanyak 20  $\mu$ L suspensi bakteri endofit diinokulasikan dengan cara diteteskan menggunakan mikropipet dan tip ke *paperdisk* yang diletakkan di atas medium NA pada cawan petri yang telah diratakan dengan suspensi bakteri uji. Diameter zona hambat yang muncul di sekitar cakram uji diukur menggunakan jangka sorong.

## 2.4 Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri Endofit yang Potensial

Inokulum dibuat dengan cara menginokulasikan tiga ose isolat murni bakteri endofit potensial secara aseptis ke dalam 2,5 ml medium NB steril pada tabung reaksi. Inkubasi dilakukan pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam pada suhu 37°C.

Sebanyak 2,5 ml starter (5% v/v) inokulum starter diinokulasi ke dalam erlenmeyer berisi 50 ml medium NB steril kemudian diagitasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm suhu selama 54 jam, sampling dilakukan setiap 6 jam sekali pada jam ke-0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 dan 54 untuk dilakukan pengukuran pertumbuhannya dengan mengukur *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer ( $\lambda = 600$  nm) dan dibuat kurva pertumbuhan bakteri endofit yang potensial.

## 2.5 Uji Aktivitas Antibakteri Supernatan Bakteri Endofit *Z. cassumunar* Roxb.

Starter dibuat dengan menginokulasikan satu ose dari masing-masing 3 isolat murni

bakteri endofit potensial secara aseptis ke dalam medium NB steril pada tabung reaksi lalu diagitasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm suhu 37°C selama 24 jam.

Sebanyak 2,5 ml starter (5% v/v) inokulum starter diinokulasi ke dalam erlenmeyer berisi 50 ml medium NB steril kemudian diagitasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm suhu 37°C selama 42 jam. 42 jam merupakan waktu yang sesuai dengan waktu optimum bakteri untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder berdasarkan hasil kurva pertumbuhan bakteri endofit yang potensial.

Sampel diambil secara aseptis sebanyak 15 ml lalu dimasukkan ke dalam *microtube* 15 ml untuk disentrifugasi pada *centrifuge* dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Hasil sentrifugasi yang didapatkan berupa pelet dan supernatan. Supernatan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri.

Pembuatan suspensi bakteri uji *P. aeruginosa* dan *S. epidermidis* dilakukan secara aseptis dengan cara masing-masing bakteri pada medium peremajaan yang berumur 24 jam diambil dengan menggunakan jarum ose lalu disuspensikan ke dalam tabung reaksi berisi 5 mL larutan NaCl steril 0,9%. Kekeruhan yang diperoleh kemudian disetarakan dengan standar McFarland 0,5 yaitu setara dengan jumlah pertumbuhan  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL. Jika bakteri uji lebih keruh, maka perlu ditambahkan larutan NaCl sedikit demi sedikit hingga kekeruhannya sama dengan larutan standar McFarland 0,5.

Kontrol yang digunakan adalah kontrol positif dari kloramfenikol dengan konsentrasi 30 µg/ml yang dilarutkan ke dalam *aquadest* steril dan kontrol negatif dari medium NB yang tidak ditumbuhi bakteri apapun. Masing-masing kontrol diambil sebanyak 20 µl kemudian ditetaskan pada kertas cakram 6 mm secara aseptis.

Uji daya hambat bakteri dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan *paperdisk*. Sebanyak 20 µL supernatan diinokulasikan dengan cara ditetaskan menggunakan mikropipet dan tip ke *paperdisk* yang diletakkan di atas medium NA

pada cawan petri yang telah diratakan dengan *spread* dengan suspensi bakteri uji. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Diameter zona hambat yang muncul di sekitar cakram uji diukur menggunakan jangka sorong.

## 2.6 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara eksperimental dengan dua faktor. Faktor pertama berupa isolat bakteri endofit bangle, sebanyak tiga isolat potensial yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji. Faktor kedua berupa bakteri uji, sebanyak dua bakteri penyebab penyakit kulit yaitu *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis*. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Rancangan percobaan dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial dan uji *Univariate* pada taraf 5 %. Jika terdapat beda nyata dilanjutkan uji lanjut dengan menggunakan uji Duncan untuk mengetahui pengaruh yang paling baik. Data kuantitatif berupa diameter zona hambat (zona bening) pada medium agar kemudian data tersebut dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS 16.0.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1 Hasil Isolasi dan Pemurnian Bakteri Endofit

Isolasi bakteri endofit tanaman bangle dimulai dengan proses sterilisasi permukaan bagian tanaman yang digunakan yaitu rimpang, akar, batang dan daun. Sterilisasi permukaan dilakukan bertujuan untuk membunuh mikroba yang ada dipermukaan (mikroba epifit) tanaman bangle sehingga yang diperoleh adalah benar-benar mikroba endofit yang berasal dari jaringan tanaman bangle. Hal ini sesuai dengan Kusumawati (2014), tujuan sterilisasi permukaan adalah untuk mengeliminasi kontaminasi mikroba yang berada di permukaan tanaman (mikroba epifit), sehingga bakteri yang tumbuh pada medium isolasi merupakan benar-benar bakteri endofit.

Khusus untuk medium NA isolasi bakteri endofit ditambahkan nistatin 0,01% (b/v).

Penambahan nistatin dilakukan pada saat medium selesai disterilisasi saat suhu sudah tidak terlalu panas. Penambahan nistatin pada medium isolasi bertujuan sebagai antifungal untuk mengoptimalkan hasil isolasi yaitu menekan atau menghambat pertumbuhan fungi sehingga yang tumbuh adalah bakteri endofit. Hal ini sesuai dengan pendapat Kumala dan Siswanto (2007), penambahan nistatin (antifungi) pada medium juga bertujuan untuk mengoptimalkan hasil isolasi. Penambahan nistatin ini tidak berpengaruh terhadap bakteri endofit karena nistatin hanya mampu menghambat berbagai jamur dan ragi tetapi tidak aktif terhadap bakteri, protozoa dan virus.

Bakteri endofit yang telah diperoleh dari proses isolasi selanjutnya dilakukan pemurnian. Proses pemurnian ini bertujuan untuk mendapatkan kultur murni dari bakteri endofit tanaman bangle. Isolat yang berbeda dimurnikan dengan cara metode kuadran dan diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C sehingga diperoleh kultur koloni mikroba murni, yaitu isolat yang hanya mengandung satu bentuk morfologi koloni yang sama.

**Tabel 1.** Hasil Pemurnian Isolat Bakteri Endofit Tanaman Bangle

No.	Bagian Tanaman	Jumlah Isolat	Isolat
1.	Daun	4 Isolat	Da_1, Da_2, Da_3, Da_4
2.	Batang	4 Isolat	Ba_1, Ba_2, Ba_3, Ba_4
3.	Akar	4 Isolat	Ak_1, Ak_2, Ak_3, Ak_4
4.	Rimpang	4 Isolat	Ri_1, Ri_2, Ri_3, Ri_4

Tabel 1. hasil pemurnian isolat bakteri endofit tanaman bangle diperoleh 16 isolat bakteri antara lain, 4 isolat dari rimpang, 4 isolat dari akar, 4 isolat dari batang dan 4 isolat dari daun. Koloni bakteri endofit yang telah murni dipindahkan ke dalam medium NA miring yang dibuat sebagai *stock culture* dan *work culture* yang digunakan dalam setiap tahapan pengujian selanjutnya.

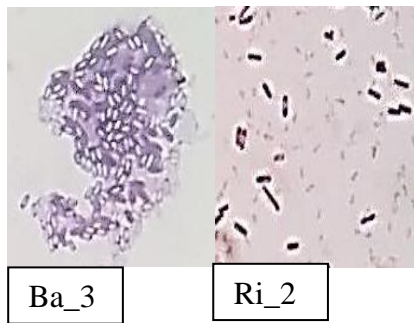
### 3.2 Hasil Karakteristik Morfologi Bakteri Endofit Tanaman Bangle

Isolat yang telah murni selanjutnya dikarakterisasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis. Karakteristik makroskopis dengan melihat secara langsung koloni meliputi; bentuk koloni, tepian koloni, elevasi koloni dan warna koloni sedangkan karakteristik secara mikroskopis dengan pengecatan Gram. Karakterisasi morfologi bertujuan untuk mengamati morfologi koloni maupun morfologi sel bakteri pada isolat yang telah dimurnikan.

**Tabel 2.** Karakteristik Morfologi Sel Bakteri Endofit Tanaman Bangle

Isolat	Morfologi Sel	
	Gram	Bentuk
Da_1	Negatif	Basil Rod
Da_2	Negatif	Basil Rod
Da_3	Negatif	Basil Rod
Da_4	Negatif	Basil Rod
Ba_1	Positif	Basil, Berendospora
Ba_2	Negatif	Basil
Ba_3	Positif	Basil, Berendospora
Ba_4	Positif	Basil, Berendospora
Ak_1	Positif	Basil
Ak_2	Positif	Basil, Berendospora
Ak_3	Negatif	Basil
Ak_4	Positif	Basil, Berendospora
Ri_1	Negatif	Basil Rod
Ri_2	Positif	Basil
Ri_3	Negatif	Basil Rod
Ri_4	Negatif	Basil Rod

Tabel 2. menunjukkan hasil karakteristik morfologi sel bakteri endofit tanaman bangle dengan menggunakan pewarnaan Gram. Hasil pewarnaan Gram pada enam belas isolat bakteri endofit tanaman bangle menunjukkan jenis yang bervariasi yaitu terdapat bakteri Gram positif dan Gram negatif dengan bentuk basil meliputi basil, basil rod dan basil yang berendospora. Berikut merupakan salah satu gambar dari isolat bakteri endofit tanaman bangle pada isolat Ba\_3 dan Ri\_2,



**Gambar 1.** Karakteristik Mikroskopis Isolat Bakteri Endofit Ba\_3 dan Ri\_2

Gambar 1. menunjukkan bahwa isolat Ba\_3 merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk basil berendospora dan isolat Ri\_2 merupakan bakteri Gram positif berbentuk basil saja. Pewarnaan Gram merupakan pewarnaan diferensial dengan menggunakan berbagai macam reagen warna yang bertujuan untuk membedakan bakteri menjadi dua golongan yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Perbedaan warna Gram pada bakteri dipengaruhi oleh perbedaan struktur dinding sel bakteri. Penyusun utama dinding sel pada bakteri adalah peptidoglikan. Hal ini sesuai dengan Madigan (2011), Penyusun utama dinding sel pada bakteri adalah peptidoglikan. Peptidoglikan merupakan sebuah polisakarida yang terdiri dari dua macam gula turunan, yaitu *N-acetylglucosamine* (NAG) dan *N-acetylmuramic acid* (NAM). Selain itu, peptidoglikan juga disusun oleh beberapa asam amino, seperti D-alanine, L-alanine, D-glutamic acid, lysine atau struktur mirip analog asam amino yang disebut DAP. Semua komponen tersebut dikoneksikan sehingga membentuk struktur berulang yang disebut *glycan tetrapeptide*. Sel memanfaatkan dinding sel untuk menahan tekanan tersebut dan mencegah sel dari pelisisan.

Dinding sel bakteri Gram positif umumnya tersusun oleh peptidoglikan yang tebal dan mengandung *teichoic acid* (asam teikoat) sedangkan dinding sel bakteri Gram negatif tersusun oleh peptidoglikan yang tipis dan sebagian besar disusun oleh lipid. Hal ini sesuai dengan pendapat Tortora (2010), Bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif dibedakan

berdasarkan struktur dinding selnya. Bakteri Gram positif memiliki beberapa lapisan peptidoglikan sehingga lapisan peptidoglikannya tebal. Umumnya, 90% penyusun dinding sel bakteri Gram positif merupakan peptidoglikan. Berbeda halnya dengan bakteri Gram positif, bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tipis. Namun, dinding sel bakteri Gram negatif mempunyai membran luar. Membran luar terdiri dari lipopolisakarida (LPS), lipoprotein, dan fosfolipid.

**Tabel 3.** Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Endofit Tanaman Bangle

Isolat	Bentuk	Morfologi Koloni		
		Warna	Margin	Elevasi
Da_1	Circular	Putih susu	Serrate	Raised
Da_2	Circular	Putih susu	Entire	Raised
Da_3	Circular	Putih susu	Entire	Raised
Da_4	Irregular	Putih susu	Serrate	Raised
Ba_1	Circular	Putih kuning	Entire	Convex
Ba_2	Irregular	Putih keruh	Lobate	Convex
Ba_3	Irregular	Putih keruh	Lobate	Convex
Ba_4	Irregular	Putih kuning	Serrate	Flat
Ak_1	Irregular	Putih keruh	Serrate	Flat
Ak_2	Irregular	Putih keruh	Lobate	Flat
Ak_3	Irregular	Putih kuning	Lobate	Flat
Ak_4	Irregular	Putih kuning	Lobate	Flat
Ri_1	Irregular	Putih kuning	Lobate	Raised
Ri_2	Irregular	Putih kuning	Lobate	Raised
Ri_3	Circular	Putih kuning	Entire	Raised
Ri_4	Circular	Putih kuning	Entire	Raised

Tabel 3. menunjukkan karakteristik morfologi koloni bakteri endofit tanaman bangle. Hasil pengamatan secara makroskopis bakteri endofit tanaman bangle memiliki bentuk koloni bervariasi yaitu *Circular* dan *Irregular*. Bentuk tepian seperti *serrate*, *lobate* dan *entire*. Warna koloni yaitu putih susu, putih keruh dan putih kekuningan. Elevasi koloni meliputi *raised*, *convex* dan *flat*.

### 3.3 Hasil Skrining Bakteri Endofit Bangle dengan Metode Difusi Cakram

Skrining bakteri endofit tanaman bangle menggunakan suspensi isolat bakteri endofit tanaman bangle dengan metode difusi cakram *paperdisk*. Skrining merupakan proses seleksi isolat bakteri endofit potensial dari semua isolat bakteri endofit yang diperoleh. Isolat potensial adalah isolat yang mempunyai diameter zona hambat paling besar dan dapat menghambat kedua jenis bakteri uji *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabel 4. Hasil Rata-Rata Skrining Bakteri Endofit Tanaman Bangle

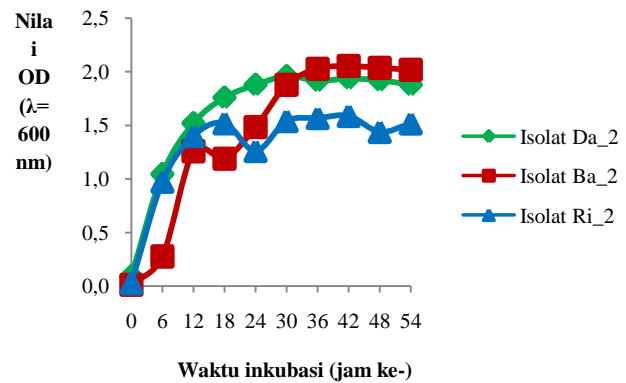
Isolat	<i>S. epidermidis</i> X Rata-Rata (mm ± SD)	<i>P. aeruginosa</i> X Rata-Rata (mm ± SD)
Da_1	6,22 ± 0,11	6,02 ± 0,03
<b>Da_2</b>	<b>6,80 ± 0,18</b>	<b>7,21 ± 0,34</b>
Da_3	6,15 ± 0,17	6,01 ± 0,01
Da_4	6,22 ± 0,33	6,12 ± 0,10
Ba_1	6,08 ± 0,07	6,20 ± 0,16
<b>Ba_2</b>	<b>6,67 ± 0,38</b>	<b>6,71 ± 0,28</b>
Ba_3	6,02 ± 0,03	6,13 ± 0,10
Ba_4	6,17 ± 0,10	6,20 ± 0,10
Ri_1	6,03 ± 0,03	6,07 ± 0,05
<b>Ri_2</b>	<b>6,62 ± 0,11</b>	<b>6,65 ± 0,45</b>
Ri_3	6,09 ± 0,04	6,02 ± 0,03
Ri_4	6,09 ± 0,08	6,04 ± 0,05
Ak_1	6,08 ± 0,10	6,04 ± 0,08
Ak_2	6,18 ± 0,16	6,02 ± 0,03
Ak_3	6,05 ± 0,05	6,07 ± 0,12
Ak_4	6,15 ± 0,15	6,00 ± 0,00

Tabel 4. menunjukkan hasil rata-rata skrining bakteri endofit tanaman bangle. Berdasarkan hasil skrining diperoleh tiga isolat bakteri endofit yang paling potensial

menghambat bakteri uji *S. epidermidis* dan *P. aeruginosa* yaitu isolat Da\_2 dari bagian daun dengan diameter zona hambat sebesar 6,80 mm dan 7,21 mm, isolat Ba\_2 dari bagian batang dengan diameter zona hambat sebesar 6,67 mm dan 6,71 mm serta isolat Ri\_2 dari bagian rimpang dengan diameter zona hambat sebesar 6,62 mm dan 6,65 mm. Isolat Da\_2, Ba\_2 dan Ri\_2 merupakan isolat potensial yang bersifat bakterisidal karena mampu menghambat kedua bakteri uji yaitu bakteri Gram positif *Staphylococcus epidermidis* dan bakteri Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri Endofit yang Potensial

Kurva pertumbuhan bakteri dibuat dengan melakukan sampling setiap 6 jam sekali pada jam ke-0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 dan 54 untuk dilakukan pengukuran pertumbuhannya dengan mengukur *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ).



Gambar. 2. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Endofit Potensial

Grafik pada Gambar 2. diatas terlihat bahwa pada ketiga isolat bakteri endofit tanaman bangle potensial yaitu isolat Da\_2, Ba\_2 dan Ri\_2 memiliki fase pertumbuhan yang terdiri dari 4 fase yaitu fase lag (fase adaptasi), fase log (eksponensial), fase stasioner serta fase penurunan dan kematian. Hasil pengukuran kurva pertumbuhan menunjukkan bahwa fase adaptasi ketiga isolat potensial sama



berada dalam rentang waktu jam ke-0 hingga jam ke-6. Selama fase ini bakteri mulai menyesuaikan diri pada lingkungan sehingga belum mengalami pertumbuhan. Hal ini sesuai pendapat Mardalena (2016), Pada fase lag peningkatan jumlah bakteri berlangsung lambat hal ini disebabkan bakteri sedang melakukan proses aklimatisasi terhadap kondisi lingkungan (pH, suhu dan nutrisi).

Fase log (eksponensial) pada ketiga isolat potensial berbeda-beda. Isolat Da\_2 terjadi fase log pada jam ke-6 hingga jam ke-24, Isolat Ba\_2 terjadi fase log pada jam ke-6 hingga jam ke-30 dan Isolat Ri\_2 terjadi fase log pada jam ke-6 hingga jam ke-18. Sel bakteri pada fase log mengalami peningkatan pertumbuhan cukup pesat dengan cara membelah diri. Hal ini sesuai dengan pendapat Muhsinin *et al.* (2016), Sel bakteri pada fase eksponensial terjadi reproduksi secara aseksual dengan memisahkan diri sehingga mengalami peningkatan pertumbuhan.

Fase stasioner (konstan) ketiga isolat potensial berada dalam rentang waktu yang berbeda-beda yaitu Isolat Da\_2 terjadi fase log pada jam ke-24 hingga jam ke-42, Isolat Ba\_2 terjadi fase log pada jam ke-30 hingga jam ke-42 dan Isolat Ri\_2 terjadi fase log pada jam ke-18 hingga jam ke-42. Pada jam ke 42 ini bakteri mulai akan mengalami penurunan, ini berarti fase akhir stasioner mulai tercapai, sehingga ketiga isolat potensial memiliki fase akhir stasioner yang sama sebagai penentu waktu produksi metabolit sekunder bakteri endofit. Fase stasioner terjadi apabila jumlah sel bakteri yang tumbuh sama dengan jumlah sel bakteri yang mati. Menurut Muhsinin *et al.* (2016), Fase stasioner, ditandai dengan penambahan bakteri dari jumlah sel yang tumbuh sebanding dengan jumlah sel mati. Ini terjadi, karena sumber nutrisi dalam medium mulai menurun sehingga bakteri endofit akan menghasilkan metabolit sekunder sebagai pertahanan terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim. Pada fase akhir stasioner, metabolit sekunder banyak diproduksi karena bakteri saling mempertahankan diri untuk bertahan hidup dengan cara mengeluarkan metabolit sekundernya.

Hal ini sesuai pendapat Ruiz *et al.* (2010), Metabolit sekunder mikroba biasanya diproduksi selama fase akhir pertumbuhan (idiophase). Metabolit sekunder disebabkan oleh habisnya nutrisi mikroba, tekanan lingkungan, dan kondisi pertumbuhan terbatas sehingga terjadi penurunan tingkat pertumbuhan. Metabolit sekunder tidak penting untuk pertumbuhan mikroba namun produksinya melayani beragam fungsi untuk bertahan hidup di alam.

Fase penurunan dan kematian ketiga isolat potensial berada dalam rentang waktu yang sama yaitu jam ke-42 hingga jam ke 54. Fase penurunan dan kematian ini disebabkan karena nutrisi dalam media dan cadangan energi mulai menipis. Menurut Madigan (2011) mengungkapkan bahwa, fase penurunan dan kematian disebabkan karena pertumbuhan sel mulai terhenti dan bakteri telah menghabiskan energi cadangan (ATP) untuk respirasinya, sehingga sel bakteri banyak yang mati.

Pertumbuhan antara bakteri satu dengan lainnya terjadi perbedaan disebabkan oleh kemampuan bakteri yang berbeda-beda dalam berkembang biak, tergantung pada medium pertumbuhan, pH, suhu, kemampuan membelah, kemampuan bertahan hidup, waktu inkubasi, kandungan enzim, kandungan metabolit sekunder dan nutrisi yang ada. Hal ini sesuai dengan pendapat Iqlima (2017), faktor pertumbuhan bakteri bergantung pada pH dan suhu. Suhu optimum pertumbuhan bakteri adalah 37°C.

### **3.5 Hasil Aktivitas Antibakteri Supernatan Bakteri Endofit Potensial terhadap Bakteri Uji *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa***

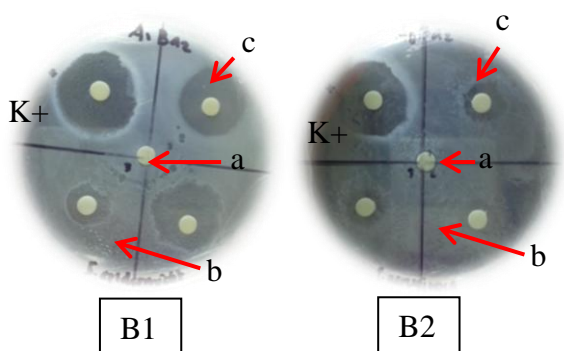
Pengujian antibakteri supernatan isolat bakteri endofit potensial dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan *paperdisk*. Besarnya aktivitas antibakteri ditentukan dengan besarnya zona hambat atau zona bening yang terdapat disekitar *paperdisk*.

**Tabel 5.** Diameter zona hambat supernatan bakteri endofit potensial dan kontrol positif terhadap bakteri uji *S. epidermidis* dan *P. aeruginosa*



Isolat Bakteri Endofit	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (mm± SD)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (mm± SD)
Da_2	8,00 ± 0,01	7,01 ± 0,01
Ba_2	<b>26,00 ± 0,01</b>	<b>13,99 ± 0,02</b>
Ri_2	9,98 ± 0,01	8,02 ± 0,01
Kontrol Positif	26,99 ± 0,02	25,02 ± 0,02

Tabel 5. menunjukkan adanya aktivitas antibakteri supernatan isolat bakteri dari tanaman bangle yang berpotensi terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* ditunjukkan dengan adanya zona hambat disekitar *paperdisk*. Diameter zona hambat terbesar pada isolat Ba\_2 terhadap bakteri uji *S. epidermidis* sebesar 26 mm yang dapat dikategorikan sangat kuat sedangkan pada Isolat bakteri endofit Ba\_2 terhadap *P. aeruginosa* sebesar 13,99 mm dapat dikategorikan kuat. Hal ini sesuai dengan pendapat dari Sipriyadi *et al* (2016) yaitu kekuatan daya hambat bakteri dikategorikan atas besarnya zona hambat; sangat kuat (zona bening > 20 mm), kuat (zona bening 10-20 mm), sedang (zona bening 5-10 mm) dan lemah (zona bening < 5 mm).



**Gambar 3.** Aktivitas antagonisme isolat bakteri endofit tanaman bangle. B1 merupakan uji antagonisme bakteri endofit dengan *S. epidermidis* sedangkan B2 merupakan bakteri endofit yang diujikan dengan *P. aeruginosa*. (a) merupakan kertas cakram yang diberi isolat bakteri endofit, (b) merupakan bakteri uji, dan (c) merupakan zona hambat yang dihasilkan, K+ yaitu kontrol positif.

Gambar 3. menunjukkan besarnya zona hambat supernatan isolat bakteri endofit Ba\_2 terhadap *S. epidermidis* dan

*P. aeruginosa*. Besarnya zona hambat supernatan isolat bakteri endofit Ba\_2 terhadap *P. aeruginosa* sebelum dapat menyamai efek antibiotik kloramfenikol 30 mg/ml sedangkan besarnya zona hambat supernatan isolat bakteri endofit Ba\_2 terhadap *S. epidermidis* sudah hampir dapat menyamai efek antibiotik kloramfenikol 30 mg/ml. Hal ini karena metabolit sekunder dari supernatan isolat bakteri endofit tanaman bangle belum benar-benar murni masih terdapat berbagai campuran senyawa didalam supernatan seperti debris sel atau senyawa lain yang tidak diperlukan untuk antibakteri.

Kontrol positif yang digunakan yaitu kloramfenikol 30 mg/ml. Menurut Jumrah (2016), Kloramfenikol adalah jenis antibiotik berspektrum luas yang dapat menghambat bakteri gram positif dan negatif. Besarnya zona hambat kontrol positif terhadap *S. epidermidis* adalah 26.99 mm sedangkan terhadap *P. aeruginosa* sebesar 25,02 mm. Menurut Wardhani dan Sulistyani (2012), kontrol positif yang berupa obat ini berfungsi untuk mengetahui kadar obat yang dapat membunuh bakteri sehingga dapat digunakan sebagai pembanding. Kontrol negatif yang digunakan yaitu *paperdisk* yang diberi medium NB yang tidak ditumbuhkan bakteri apapun.

Aktivitas antibakteri dari supernatan isolat bakteri endofit tanaman bangle berbeda satu dengan yang lainnya terhadap bakteri uji dapat dilihat menggunakan analisis statistik, yaitu digunakan uji *Univariate* yang dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil uji *Univariate* dari diameter zona hambat antarasupernatan tiga isolat bakteri endofit tanaman bangle (Da\_2, Ba\_2 dan Ri\_2), dua bakteri uji (*S. epidermidis* dan *P. aeruginosa*) dan interaksi antara isolat bakteri endofit dengan bakteri uji (perlakuan) menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,00. Nilai tersebut lebih kecil dari 0,05 yang berarti bahwa pengujian daya hambat antarasupernatan berbeda nyata secara signifikan satu dengan yang lainnya.

Deksriptif hasil uji *univariate* dapat diketahui pada estimasi rata-rata marginal. Aktivitas antibakteri supernatan isolat

Ba<sub>2</sub> menunjukkan efek yang paling baik dibandingkan dengan supernatanisolat Da<sub>2</sub> dan Ri<sub>2</sub>. Hal ini dikarenakan kemampuan setiap isolat bakteri endofit dalam menghasilkan metabolit sekunder yang berbeda-beda. Efek sensitivitas bakteri uji dihambat oleh bakteri endofit lebih sensitif bakteri uji *S. epidermidis* (bakteri Gram positif) dibandingkan dengan *P. aeruginosa* (bakteri Gram negatif). Hal ini disebabkan adanya perbedaan struktur penyusun dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif dalam mempertahankan diri dari senyawa antibakteri supernatan bakteri endofit.

Hasil interaksi antara isolat bakteri endofit dengan bakteri uji menunjukkan diameter zona hambat terbesar pada isolat Ba<sub>2</sub> terhadap bakteri uji *S. epidermidis* sebesar 26 mm. Hal ini kemungkinandikarenakan senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh isolat bakteri endofit tanaman bangle terutama isolat Ba<sub>2</sub> diduga banyak mengandung senyawa antibakteri yang dapat merusak dinding sel bakteri Gram positif. Dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari komponen utama peptidoglikan yang tipis dan asam teikoat. Mekanisme antibakteri senyawa antibakteri isolat bakteri endofit tanaman bangle kemungkinan dapat menyebabkan hilangnya permeabilitas dinding sel sehingga dapat menyebabkan kematian sel.

Bakteri uji yang paling sensitif dihambat oleh supernatan isolat bakteri endofit adalah bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Menurut Harris *et al* (2002), *Staphylococcus epidermidis* adalah bakteri Gram positif dengan koagulasi negatif. *Staphylococcus epidermidis* memiliki dinding peptidoglikan yang tebal. Peptidoglikan adalah komponen dasar dari dinding sel, dan membentuk 50% dari massa dinding sel. Peptidoglikan dan asam teikoat bersama-sama hanya menyumbang sekitar 90% dari berat dinding sel, sisanya terdiri dari protein permukaan, exoprotein, dan hidrolase peptidoglikan (autolisis). Beberapa komponen ini terlibat di dalam menempelkannya bakteri ke permukaan dan merupakan penentu virulensi. Oleh karena itu, kemungkinan

senyawa antibakteri dari isolat bakteri endofit tanaman bangle adalah senyawa antibakteri yang memiliki mekanisme antibakteri dalam merusak dinding sel yang terdiri dari komponen utama yaitu peptidoglikan dan asam teikoat sehingga hilangnya permeabilitas dinding sel serta menyebabkan kematian sel pada bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

Berbeda halnya dengan bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* yang merupakan bakteri Gram negatif. Menurut Chevalier (2017), *P. aeruginosa* adalah bakteri Gram-negatif, yang memiliki membran luar dan diatur oleh protein  $\beta$ -barrel sehingga lebih kompleks mekanisme transport zatnya.

#### 4. Kesimpulan

Bakteri endofit tanaman bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) isolat Da<sub>2</sub>, Ba<sub>2</sub> dan Ri<sub>2</sub> memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *S. epidermidis* dan *P. aeruginosa*. Aktivitas antibakteri dengan efek terbaik dilakukan oleh bakteri endofit isolat Ba<sub>2</sub> diikuti dengan bakteri endofit Da<sub>2</sub> dan Ri<sub>2</sub>.

#### Daftar Pustaka

- Chevalier, S., E. Bouffartigues, J. Bodilis, O. Maillot, O. Lesouhaitier, M. G. J. Feuilloley, N. Orange, A. Dufour dan P. Cornelis. 2017. Structure, Function and Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Porins. *FEMS Microbiology Reviews*, 41 (5) : 698–722.
- Harris L. G., S.J. Foster 2, dan R.G. Richards. 2002. An Introduction to *Staphylococcus aureus*, and Techniques for Identifying and Quantifying *S. aureus* Adhesins In Relation to Adhesion to Biomaterials: Review. *European Cells and Materials*, 4 (1): 39-60.
- Iqlima, D., P. Ardiningsih, M. A. Wibowo. 2017. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit B<sub>2d</sub> Dari Batang

- Tanaman Yakon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Rob.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypimurium*. *JKK*, 7(1) : 36-43.
- Jawetz, E. *et al.* 2010. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi XX*, Diterjemahkan oleh Edi Nugroho dan RF. Maulany. Jakarta Penerbit EGC. 53, 211-238.
- Jumrah, E. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit Potensial lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*) dan Analisis Senyawa Antibakteri. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2011. *Profil Kesehatan Indonesia 2010*. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Kumala S, Siswanto E.B. 2007. Isolation and Screening of Endophytic Microbes from *Morinda citrifolia* and their Ability to Produce Anti-Microbial Substances. *Microbiol. Indones.* 1 (3) : 145-148.
- Kusumawati D.E., Fachriyan H.P., Maria B. 2014. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit dari Tanaman Miana (*Coleus scutellariodes* L. Benth.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Journal Current Biochemistry*. 1(1): 45-50.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, D. A. Stahl, D. P. Clark. 2011. *Brock biology of microorganisms*, 13th ed. Pearson Education Inc.
- Mardalena. 2016. Fase Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) Tempoyak Asal Jambi yang Disimpan Pada Suhu Kamar. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 11 (1) : 58-66.
- Muhsinin, S., Rizal M. B. dan Laida N. M. 2016. Isolation of endophytic bacteria from plant basil (*Ocimum sanctum* L.) as antibacterials against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences (JIPBS)*, 3 (4) : 92-96.
- Oktaviani, F., A. Mukaddas, I. Faustine. 2016. Profil Penggunaan Obat Pasien Penyakit Kulit di Poliklinik Kulit dan Kelamin RSUD Anutapura Palu. *Galenika Journal of Pharmacy*. 2 (1) : 38 – 42.
- Pujiyanto, S., Y. Lestari, A. Suwanto, S. Budiarti, L.K. Darusman. 2012. Alpha-Glucosidase Inhibitor Activity and Characterization of Endophytic Actinomycetes Isolated from Some Indonesian Diabetic Medicinal Plants. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(1): 327-333.
- Purwanto U.M.S., Fachriyan H.P., Maria B. 2014. Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Potensinya sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri. *Journal Current Biochemistry*. 1(1): 51-57.
- Ruiz, B., Adán C. , Angela F., Yolanda G. H., Alba R. , Mauricio S. , Diana R., Brenda S., Romina R. S., Sergio S., and Elizabeth L. 2010. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(2): 146–167.
- Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J., Dowling D.N. 2008. Minireview Bacterial Endophytes: Recent Development and Application. *FEMS Microbiol Lett*. 278: 1-9.
- Sipriyadi, Lestari, Y., Wahyudi, A. T., Maryandini, A. 2016. Potential Actinomycetes from CIFOR forest origin as antimicrobial, antifungal and producing extracellular xylanase. *Biosantifika : Journal of Biology and Biology Education*, 81 (1) : 96-104.
- Sulaiman, F.A. N. Fuad, F. Rahman, A. Iqbal dan D.S. Darnis. 2016. Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Tinospora crispa* (Putarwali) Stems Methanolic

Extract. *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)*. 78 (11) : 35-40.

Tirtaningrum, A.Y. 2014. Pengaruh Dosis Infusa Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb) Pada Proses Perendaman Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) Terhadap Jumlah Bakteri *Escherichia coli*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.

Tortora, G. J., B. R. Funke & C. L. Case. 2010. *Microbiology: An introduction*, 10th ed.

Yenny dan E. Herwana. 2007. Resistensi Dari Bakteri Enterik : Aspek Global Terhadap Antimikroba. *Universa Medicina*. 26(1) : 46-56.

Wardhani, L.K. dan N. Sulistyani. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) terhadap *Shigella flexneri* beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. 2 (1) : 1-16.