



Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Potensinya sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri

Ukhradiya Magharaniq Safira Purwanto^{1*}, Fachriyan Hasmi Pasaribu², Maria Bintang³

¹*Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 16680, Indonesia*

²*Bagian Mikrobiologi Medik, Laboratorium Bakteriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 16680, Indonesia*

³*Departemen Biokimia, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 16680, Indonesia*

Received: 11 February 2014 Accepted: 24 March 2014

Corresponding author: Ukhradiya Magharaniq Safira Purwanto, S.Si, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 16680, Indonesia. E-mail : ukhradiya@gmail.com

ABSTRACT

*Endophytic bacteria are beneficial microorganisms that interact with host plants without causing disruption or damage to the host. Some studies suggest that certain endophytic bacteria can produce chemical compounds that have an effect on health, especially endophytic bacteria isolated from medicinal plants. Green betel (*Piper betle* L.) is a medicinal plant that has been used for years and has many benefits. The purposes of this study are to isolating and screening of endophytic bacteria from green betel against four pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*). The number of endophytic bacteria that has been isolated are 14 isolates. Based on the screening results, three isolates of endophytic bacteria have potential activity (characterized by the formation of inhibition zone) against *S. aureus*. The inhibition zone may indicate that those isolates produce compounds that have antibacterial effects. Those isolates are ASI, BSI and BS2. The biggest inhibition zone showed by BSI, so it can be concluded that BSI is the most potential isolate as a novel source of antibacterial compound.*

Keywords: *antibacterial, endophytic bacteria, Piper betle L..*

ABSTRAK

*Bakteri endofit merupakan mikroorganisme menguntungkan yang berinteraksi dengan tanaman inang tanpa menyebabkan gangguan atau kerusakan pada tanaman tersebut. Beberapa studi menunjukkan bahwa bakteri endofit tertentu dapat memproduksi senyawa kimia yang memiliki efek bagi kesehatan, terutama bakteri endofit yang diisolasi dari tanaman obat. Sirih hijau (*Piper betle* L.) merupakan tanaman obat yang telah lama digunakan dan memiliki banyak manfaat. Tujuan dari penelitian ini ialah mengisolasi dan melakukan penapisan bakteri endofit dari sirih hijau melalui uji terhadap empat jenis bakteri patogen (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* dan *Salmonella enteritidis*). Jumlah bakteri endofit yang berhasil diisolasi sebanyak 14 isolat. Berdasarkan hasil penapisan diperoleh 3 isolat bakteri endofit yang memiliki aktivitas potensial (ditandai dengan terbentuknya zona hambat) terhadap *S. aureus*. Terbentuknya zona hambat mengindikasikan kemungkinan adanya senyawa yang memiliki efek antibakteri. Ketiga isolat tersebut adalah isolat dengan kode ASI, BSI dan BS2. Isolat yang menunjukkan zona hambat terbesar adalah BSI sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat tersebut merupakan isolat yang paling potensial sebagai penghasil senyawa antibakteri.*

Kata kunci : *antibakteri, bakteri endofit, Piper betle L.*

1. PENDAHULUAN

Antibiotik telah lama digunakan sebagai pencegahan dan pengobatan penyakit. Penggunaan antibiotik semakin meningkat seiring dengan peningkatan kasus penyakit, terutama penyakit infeksi. Sebagian besar antibiotik yang secara komersil digunakan merupakan antibiotik sintetik yang rentan memicu resistensi terhadap patogen, terutama bakteri (Ruhe *et al* 2005; Kiyomizu *et al* 2008; Savini *et al* 2009). Eksplorasi untuk menemukan sumber antibiotik alami yang baru perlu dilakukan. Salah satunya dengan memanfaatkan bakteri endofit.

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman inang tanpa menyebabkan gejala-gejala penyakit (Bhore dan Sathisha 2010). Beberapa jenis bakteri endofit diketahui mampu menghasilkan senyawa aktif yang bersifat antibiotik (Castillo *et al* 2003), antimalaria (Simanjuntak *et al* 2004) dan antifungi (Beck *et al* 2003). Kemampuan bakteri endofit menghasilkan senyawa aktif tersebut merupakan potensi yang dapat dikembangkan mengingat umumnya senyawa aktif diperoleh dengan mengekstraksi tanaman, khususnya tanaman obat. Untuk memperoleh senyawa aktif dari tanaman dibutuhkan waktu dan proses yang lebih rumit dibandingkan jika mengekstraksi senyawa dari bakteri.

Salah satu tanaman obat yang dapat dijadikan sumber bakteri endofit adalah sirih hijau (*Piper betle* L.). Sirih hijau merupakan tanaman yang memiliki khasiat medis dan banyak digunakan di Indonesia, India dan negara-negara di wilayah Indo-Cina lainnya, yaitu Malaysia, Vietnam, Laos, Kamboja, Thailand, Myanmar dan Singapura. Bagian tanaman sirih yang banyak digunakan adalah daunnya. Kajian mengenai sirih hijau dalam bidang kesehatan telah dilakukan. Sebagai contoh, daun sirih hijau yang diekstrak dengan akuades steril menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *Streptococcus mutans* secara *in vitro* (Nalina & Rahim 2007). Al-Adhroey *et al* (2011) menyatakan bahwa ekstrak metanol daun sirih hijau memiliki aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium berghei*.

Kajian tentang manfaat sirih hijau telah dilakukan dengan mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa aktif yang terkandung di dalamnya.

Senyawa Hydroxychavicol (HC) dari sirih hijau diketahui memiliki aktivitas penghambatan terhadap xantin oksidase (Murata *et al* 2009) dan juga bersifat antifungi terhadap genus *Candida* dan *Aspergillus* dalam uji *in vitro* (Ali *et al* 2010). Senyawa yang merupakan turunan HC, yaitu Hydroxychavicol acetate (HCA) memiliki berbagai aktivitas diantaranya sebagai imunomodulator (Min *et al* 2009), antibakteri (Sharma *et al* 2009) dan anti penggumpalan darah (Chang *et al* 2007).

Allylpyrocatechol (APC) yang sebagian besar diisolasi dari daun sirih memiliki efek terhadap pencernaan diantaranya melindungi lambung dari timbulnya ulkus (luka lambung) (Tripathi 2008), menyembuhkan ulkus (Yadav *et al* 2009) dan berperan sebagai anti-inflamasi (Santhakumari *et al* 2006). Menurut (Zeng *et al* 1997 dalam Kumar *et al* 2010), senyawa Piperbetol dalam sirih memiliki kemampuan selektif dalam menghambat agregasi platelet yang diinduksi oleh mekanisme *platelet activating factor* (PAF) pada konsentrasi tertentu, sehingga diharapkan dapat mencegah timbulnya penyakit kardiovaskular. Senyawa lain yang merupakan turunan Piperbetol seperti Methylpiperbetol, Piperol A dan Piperol B juga telah berhasil diidentifikasi namun aktivitasnya belum diuji lebih lanjut.

Bakteri endofit yang berada dalam tanaman sirih hijau kemungkinan besar mampu menghasilkan salah satu senyawa aktif tersebut atau senyawa lain yang bersifat antibiotik. Sejauh ini belum dilaporkan adanya isolasi bakteri endofit dari tanaman sirih hijau serta pengujian terhadap senyawa aktif yang diproduksi bakteri endofit dari tanaman sirih hijau. Penelitian ini bertujuan mengisolasi bakteri endofit dari tanaman sirih hijau sekaligus melakukan penapisan awal untuk memperoleh isolat bakteri endofit yang berpotensi menghasilkan senyawa antibiotik, khususnya antibakteri.

2. BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah tanaman sirih (*Piper betle* L.) yang diperoleh dari daerah Ciampea-Bogor dalam kondisi segar, kultur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, dan *Salmonella enteritidis* (koleksi dari

Laboratorium Bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor), media Nutrient Agar (NA), media Nutrient Broth (NB), larutan natrium hipoklorit 5.25 %, etanol 70 %, akuades, nistatin, antibiotik kanamycin. Alat-alat yang digunakan antara lain cawan Petri, tabung reaksi, autoklaf, dan inkubator.

Metode Penelitian

Isolasi Bakteri Endofit

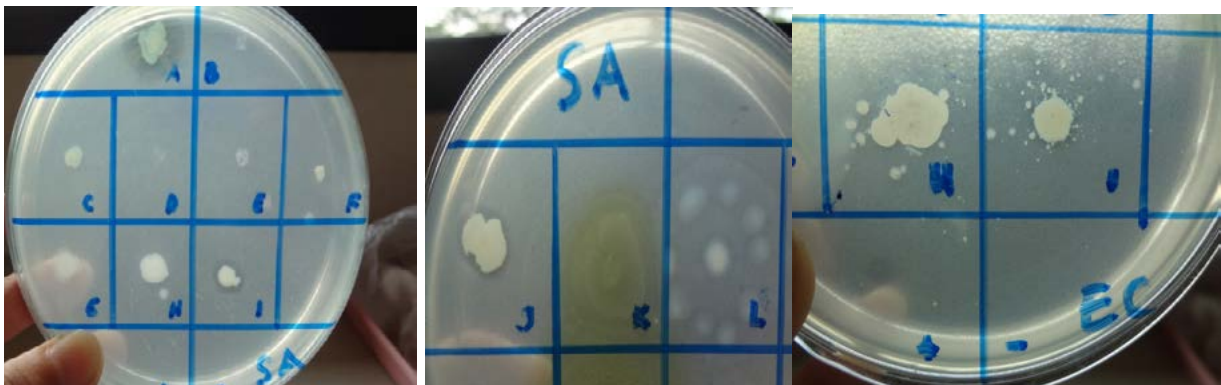
Bagian tanaman sirih yang digunakan adalah daun, batang dan akar dalam kondisi segar. Sampel tanaman dalam keadaan segar dibersihkan dengan air mengalir kemudian dipotong-potong sepanjang 1-3 cm dan dipisahkan menurut bagian tanamannya. Potongan sampel direndam dalam etanol 70 % selama 1 menit, larutan natrium hipoklorit 5.25 % selama 5 menit, dan dicuci dengan etanol 70 % sebanyak tiga kali. Potongan sampel diiris secara steril kemudian ditanam dalam media *nutrient agar* (NA) yang mengandung nistatin. Media yang sudah mengandung sampel tersebut diinkubasi pada suhu ruang dalam keadaan gelap dan diamati setiap hari sampai ada pertumbuhan koloni. Jika selama 24 jam di sekitar sampel tanaman belum menunjukkan adanya pertumbuhan mikroba, sterilisasi permukaan dikatakan berhasil. Bakteri endofit yang tumbuh dimurnikan satu per satu dan dikultivasi dalam agar miring. Isolat bakteri endofit yang telah murni diidentifikasi secara morfologi berdasarkan warna koloni, bentuk tepian koloni, elevasi koloni dan konsistensi koloni serta kecepatan pertumbuhan koloni (Modifikasi Desriani *et al.* 2013).

Penapisan untuk memperoleh isolat bakteri endofit potensial

Isolat bakteri endofit dari agar miring diregenerasi ke media NA, sedangkan bakteri uji diregenerasi ke dalam 5 mL media nutrient broth (NB) lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28-30 °C. Sebanyak 0.4 mL kultur cair bakteri uji dimasukkan ke dalam 80 mL media NA yang bersuhu ±40 °C. Lalu dituangkan sebanyak 20 mL ke dalam cawan Petri steril dan ditunggu hingga memadat. Isolat bakteri endofit yang akan diuji diinokulasikan ke media berisi patogen menggunakan ose, kemudian diinkubasi selama 24 – 48 jam. Zona hambat yang terbentuk diamati dan dibandingkan dengan kontrol positif (kanamycin 50µg/mL). Kemudian diameter zona hambat diukur dan isolat bakteri endofit yang positif menunjukkan zona hambat dikatakan sebagai isolat potensial (Simarmata *et al.* 2007).

3. HASIL

Sebanyak 14 isolat bakteri endofit telah diisolasi dari tanaman sirih hijau yang berasal dari kecamatan Ciampea, Kabupaten Bogor. Bagian tanaman sirih hijau dengan jumlah isolat bakteri endofit terbanyak adalah bagian daun (DS), yaitu sebanyak 7 isolat, kemudian diikuti oleh bagian batang (BS) sebanyak 6 isolat dan terakhir adalah bagian akar (AS) sebanyak 1 isolat (Tabel 1). Isolat bakteri endofit menunjukkan keragaman dari segi morfologi koloni. Kecepatan pertumbuhan 11 isolat terhitung dalam kategori cepat, yaitu 24 jam (1 hari), sedangkan 2 isolat termasuk dalam kategori sedang, yaitu 48 jam (2 hari) dan hanya 1 isolat yang pertumbuhannya lambat (lebih dari 2 hari) (Tabel 1).



Gambar 1 Zona hambat isolat bakteri endofit terhadap *S. aureus*. Isolat yang menunjukkan zona hambat adalah isolat dengan kode AS1 (A), BS1 (I) dan BS2 (J) dan kontrol positif kanamycin (dengan tanda panah)

Tabel 1. Morfologi koloni dan kecepatan pertumbuhan isolat bakteri endofit dari sirih hijau

Kode isolat	Morfologi koloni				Kecepatan pertumbuhan
	Warna	Tepian	Elevasi	Berlendir	
AS1	Putih	Rata	Cembung	+++	Cepat
DS1	Putih tulang	Rata	Datar	+	Cepat
DS2	Putih	Rata	Datar	++	Cepat
DS3a	Kuning cerah	Rata	Cembung	++	Sedang
DS3b	Merah muda	Rata	Datar	+	Lambat
DS4	Krem	Rata	Datar	+	Sedang
DS5	Putih	Rata	Datar	+++	Cepat
DS6	Putih tulang	Bergerigi	Datar	+	Cepat
BS1	Putih kekuningan, bagian tepi transparan	Rata	Cembung	+++	Cepat
BS2	Putih kekuningan	Rata, Licin	Cembung	+++	Cepat
BS3	Putih susu	Bergerigi	Datar	+++	Cepat
BS4	Putih mendekati transparan	Rata, Licin	Cembung	+++	Cepat
BS5	Putih susu	Bergerigi	Datar	++	Cepat
BS6	Putih	Rata	Datar	++	Cepat

Keterangan : AS=akar sirih, DS=daun sirih, BS=batang sirih; kecepatan pertumbuhan : cepat = 1 hari, sedang = 2 hari, lambat = >2 hari

Hasil penapisan isolat bakteri endofit dari tanaman sirih hijau terhadap bakteri patogen ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat berupa daerah bening di sekitar koloni bakteri endofit (Gambar 1). Sebanyak 14 isolat bakteri endofit diuji terhadap 4 bakteri patogen, yaitu *S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*, dan *S.enteritidis*. Sebanyak 3 isolat bakteri endofit, yaitu AS 1 (A), BS1 (I) dan BS2 (J) menunjukkan terbentuknya zona hambat terhadap *S. aureus* (Tabel 2). Sedangkan isolat BS3 (K) hanya menunjukkan sedikit penghambatan dan belum sepenuhnya membentuk daerah bening seperti 3 isolat lainnya. Pengujian ke-14 isolat bakteri endofit terhadap *S. enteritidis* bahkan tidak menunjukkan terbentuknya zona hambat.

4. PEMBAHASAN

Bakteri endofit dapat masuk ke dalam jaringan tanaman umumnya melalui akar, namun bagian tanaman yang terpapar udara langsung seperti bunga, batang, daun (melalui stomata) dan kotiledon, juga dapat menjadi jalur masuk bakteri endofit. Bakteri endofit yang telah masuk ke dalam tanaman dapat tumbuh hanya di satu titik tertentu atau menyebar ke seluruh tanaman. Mikroorganisme ini dapat hidup di dalam pembuluh vaskular atau di ruang intersel (Zinniel *et al.* 2002), akar, batang, daun dan buah (Simarmata *et al.* 2007; Bacon dan Hinton 2006). Hasil penelitian ini menunjukkan bakteri endofit

ditemukan di bagian akar, batang dan daun tanaman sirih hijau, meskipun di bagian akar hanya berhasil ditemukan 1 isolat. Hal ini sesuai dengan pernyataan Bacon dan Hinton (2006) yang menyatakan bahwa jumlah bakteri endofit di dalam tanaman tidak dapat ditentukan secara pasti, namun bakteri ini dapat dideteksi dengan mengisolasi pada media agar. Media agar yang digunakan untuk mengisolasi bakteri endofit pada penelitian ini adalah media *nutrient agar* (NA). Media ini merupakan media kaya yang terdiri atas *yeast extract*, pepton, NaCl dan agar. Bakteri endofit dapat hidup pada media NA dikarenakan sifat media yang kompleks dan kemungkinan besar media tersebut memiliki komposisi yang mirip seperti kondisi di dalam tanaman.

Bakteri endofit dari tanaman sirih hijau (*P. betle* L.) mulai menunjukkan pertumbuhan setelah potongan bagian tanaman diinokulasi pada media NA selama \pm 48 jam (2 hari). Pernyataan ini didukung oleh Zinniel *et al* (2002), Simarmata (2007), Arunachalam dan Gayathri (2010) dan Jalgaonwala *et al* (2010) yang menyatakan bahwa waktu pemilihan inkubasi selama minimal 2 hari bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri yang tumbuh merupakan bakteri endofit, bukan bakteri kontaminan. Selain itu, penambahan nistatin (antifungi) pada media juga bertujuan untuk mengoptimalkan hasil isolasi (Kumala dan Siswanto 2007).

Tabel 2. Diameter zona hambat yang terbentuk pada penapisan awal isolat bakteri endofit dari sirih hijau terhadap bakteri patogen

Kode isolat	Diameter zona hambat			
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>
AS1 (A)	V	-	5 mm	-
DS1 (B)	-	-	-	-
DS2 (C)	-	-	-	-
DS3a (D)	-	-	-	-
DS3b (E)	-	-	-	-
DS4 (F)	-	-	-	-
DS5 (G)	-	-	-	-
DS6 (H)	-	-	-	-
BS1 (I)	V	V	3 mm	-
BS2 (J)	-	V	1 mm	-
BS3 (K)	-	V	-	-
BS4 (L)	-	-	-	-
BS5 (M)	-	-	-	-
BS6 (N)	-	-	-	-

keterangan : V = ada zona hambat, tetapi sangat kecil dan sulit diukur

Interaksi bakteri endofit dan tanaman merupakan suatu bentuk simbiosis. Simbiosis antara tanaman dengan bakteri endofit bersifat netral, mutualisme atau komensalisme (Bacon dan Hinton 2006). Simbiosis mutualisme antara bakteri endofit dengan tanaman, dalam hal ini bakteri endofit mendapatkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman dan melindungi tanaman dalam melawan patogen, sedangkan tanaman mendapatkan derivat nutrisi dan senyawa aktif yang diperlukan selama hidupnya (Simarmata *et al* 2007).

Koloni bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari tanaman sirih hijau menunjukkan keragaman, baik dari segi warna, bentuk dan kecepatan pertumbuhan. Hal ini sesuai dengan Bhoire dan Sathisha (2010) yang menyatakan bahwa bakteri endofit pada satu tanaman inang umumnya terdiri atas beberapa genus dan spesies. Keragaman bakteri endofit dalam suatu tanaman juga dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan tanaman, khususnya kondisi tanah. Pada beberapa kasus, tanaman dengan jenis atau spesies yang sama memiliki bakteri endofit yang tidak selalu sama. Pada beberapa tanaman terdapat bakteri endofit yang spesifik dan khas menghuni tanaman tersebut.

Uji lanjutan seperti uji biokimia dan mikrobiologi tidak dilakukan untuk ke-14 isolat bakteri endofit karena tujuan utama dari penelitian ini adalah memperoleh isolat yang paling potensial dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri

patogen. Pemilihan empat jenis bakteri patogen dalam penelitian ini berdasarkan alasan bahwa bakteri-bakteri tersebut lazim digunakan sebagai model untuk pengujian senyawa aktif baru dan juga karena beberapa bakteri tersebut bersifat patogen pada manusia. Sebagai contoh, *B. cereus* dapat menyebabkan infeksi usus halus dan infeksi saluran pernafasan (Bottone 2010) dan *S. aureus* dapat menyebabkan infeksi endokarditis (Nadji *et al* 2005).

Berdasarkan hasil pengujian, sebanyak 3 isolat bakteri endofit dari tanaman sirih hijau menunjukkan penghambatan terhadap *S. aureus*. Ketiga isolat tersebut berasal dari akar (1 isolat) dan batang (2 isolat). Terbentuknya daerah bening di sekitar koloni isolat bakteri endofit mengindikasikan kemungkinan adanya senyawa antibakteri yang mampu membunuh atau setidaknya menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Hal ini diperkuat oleh Simarmata *et al* (2007) dan Kumala & Siswanto (2007) yang melakukan uji serupa dengan bakteri endofit asal tanaman obat Indonesia. Bakteri endofit yang diisolasi menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen ditandai dengan terbentuknya daerah bening di sekitar koloni bakteri endofit.

Bagian akar dan batang tanaman sirih hijau memang tidak lazim digunakan sebagai obat. Umumnya, bagian tanaman sirih hijau yang digunakan adalah bagian daun, terutama daun yang

berumur cukup tua. Namun, hal ini tidak menutup kemungkinan bahwa bakteri endofit dari bagian akar dan batang sirih hijau juga memiliki potensi sebagai sumber antibakteri baru. Sebagai contoh, penelitian yang dilakukan oleh Miller *et al* (1998) dan Castillo *et al* (2003) berhasil mengisolasi senyawa antibiotik dari bakteri endofit tanaman non-obat, yaitu sejenis rumput dan pohon berkayu.

Berdasarkan hasil penelitian, isolasi bakteri endofit dari tanaman sirih hijau (*P. betle* L.) telah berhasil dilakukan dan diperoleh 14 isolat murni. Uji penapisan isolat bakteri endofit terhadap 4 jenis bakteri patogen menunjukkan bahwa terdapat 3 isolat yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sumber antibakteri baru, khususnya terhadap *S. aureus*, yaitu isolat AS1, BS1 dan BS2. Meski demikian, penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengidentifikasi spesies isolat potensial sekaligus mengisolasi senyawa yang dihasilkan oleh isolat tersebut, terutama isolat BS1.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Al-Adhroey AH, Nor ZM, Al-Mekhlafi HM, Amran AA, Mahmud R. 2011. Antimalarial Activity of Methanolic Leaf Extract of *Piper betle* L. *Molecules* 16 : 107-118. DOI:10.3390/molecules16010107.
- Ali, I. *et al.* 2010. *In vitro* antifungal activity of hydroxychavicol isolated from *Piper betle* L. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 9 (7).
- Arunachalam C, Gayathri P. 2010. Studies on bioprospecting of endophytic bacteria from the medicina plant of *Andrographis paniculata* for their antimicrobial activity and antibiotic susceptibility pattern. *Int J of Curr Pharm. Res.* 2 (4) : 63-68.
- Bacon CW, Hinton DM. 2006. Bacterial endophytes : the endophytic niche, its occupants, and its utility. Di dalam : Gnanamanickam SS, editor. *Plant-Associated Bacteria*. Netherland : Springer.
- Beck HC, Hansen AM, Lauritsen FR. 2003. Novel pyrazine metabolites found in polymyxin biosynthesis by *Paenibacillus polymyxa*. *FEMS Microbiol Lett* 220: 67–73.
- Bhore SJ, Sathisha G. 2010. 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.* 6 (4): 345-352.
- Bottone EJ. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 23(2):382-398.
- Castillo U, *et al.* 2003. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 224: 180-190.
- Chang, MC. *et al.* 2007. Hydroxychavicol, a novel betel leaf component, inhibits platelet aggregation by suppression of cyclooxygenase, thromboxane production and calcium mobilization. *Br.J. Pharmacol.* 152 : 73–82.
- Desriani, Kusumawati DE, Rivai A, Hasanah N, Amrinola W, Triratna L, Sukma A. 2013. Potential endophytic bacteria for increasing paddy var rojolele productivity. *Int. J. on Adv. Sci., Eng. and Information Tech.* 3 (1) : 76-78.
- Jalgaonwala RE, Mohite BV, Mahajan RT. 2010. Evaluation of endophytes for their antimicrobial activity from indigenous medicinal plants belonging to north maharashtra region india . *Int. J. on Pharm and Biomed Res.* 1 (5) : 136-141.
- Kiyomizu K, Yagi T, Yoshida H, Minami R, Tanimura A, Karasuno T, Hiraoka A. 2008. Fulminant septicemia of *Bacillus cereus* resistant to carbapenem in a patient with biphenotypic acute leukemia. *J. Infect. Chemother.* 14: 361–367.
- Kumala S, Siswanto EB. 2007. Isolation and Screening of Endophytic Microbes from *Morinda citrifolia* and their Ability to Produce Anti-Microbial Substances. *Microbiol. Indones.* 1 (3) : 145-148.
- Miller CM, Miller RV, Garton-Kenny D, Redgrave B, Sears J, Condron MM, Teplow DB, Strobel GA. 1998. Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. *J. of App. Microbiol.* 84 : 937-944.
- Min HJ, Nam JW, Yu ES, Hong JH, Seo EK, Hwang ES. 2009. Effect of naturally occurring hydroxychavicol acetate on the cytokine production in T helper cells. *Int. Immunopharmacol.* 9 : 448–454.
- Murata K. *et al.* 2009. Hydroxychavicol: a potent xanthine oxidase inhibitor obtained from the leaves of betel. *Piper betle. J. Nat.Med.* 63 : 355–359.
- Nadji G *et al.* 2005. Comparison of clinical and morphological characteristics of *Staphylococcus aureus* endocarditis with endocarditis caused by other pathogens. *Heart* 91 : 932-937.

- Nalina T, Rahim ZHA. 2007. The crude aqueous extract of *Piper betle* L. and its antibacterial effect towards *Streptococcus mutans*. *American J. of Biotechnol. and Biochem.* 3 (1): 10-15.
- Ruhe JJ, Monson T, Bradsher, RW, Menon A. 2005. Use of Long-Acting Tetracyclines for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections: Case Series and Review of the Literature. *Clin. Inf. Dis.* 40:1429–1434.
- Santhakumari P, Prakasam A, Pugalendi KV. 2006. Antihyperglycemic activity of *Piper betle* leaf on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Med. Food* 9: 108–112.
- Savini V, Favaro M, Fontana C, Catavittello C, Balbinot A, Talia M, Febbo F, D'Antonio D. 2009. *Bacillus cereus* heteroresistant to carbapenems in a cancer patient. *J. Hosp. Infect.* 71:288–290.
- Sharma S. *et al.* 2009. Evaluation of the antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of hydroxychavicol for its potential use as an oral care agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 : 216–222.
- Simanjuntak P, Bustanussalam, Otovina DM, Rahayuningsih M, Said EG. 2004. Isolasi dan identifikasi artemisinin dari hasil kultivasi mikroba endofit dari tanaman *Artemisia annua*. [studi mikroba endofitik tanaman *Artemisia spp.*]. *Majalah Farmasi Indonesia* 15 (2) : 68-74.
- Simarmata R, Lekatompessy S, Sukiman H. 2007. Isolasi mikroba endofitik dari tanaman obat sambung nyawa (*Gymura procumbens*) dan analisis potensinya sebagai antimikroba. *Berk Penel Hayati* 13 : 85-90.
- Tripathi S. 2008. Chemical investigation of betel vine (*Piper betle* L.) as antioxidant agent [Ph D thesis]. Lucknow University, Lucknow.
- Yadav SK, Adhikary B, Maity B, Bandyopadhyay SK, Chattopadhyay S. 2009. The gastric ulcer-healing action of allylpyrocatechol is mediated by modulation of arginase metabolism and shift of cytokine balance. *Eur. J. Pharmacol.* 614 :106–113.
- Zeng HW, Jiang YY, Cai DG, Bian J, Long K, Chen ZL. 1997. Piperbetol, methylpiperbetol, piperol A and piperol B: a new series of highly specific PAF receptor antagonists from *Piper betle*. *Planta Med.* 63 : 296–298.
- Zinniel DK *et al.* 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (5) : 2198–2208.