**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT DAUN SIRIH HUTAN DENGAN MENGGUNAKAN GEN 16SRRNA**

Diza Sartika^{}, Nessa, Ria Afrianti, Rilla Salsabila*

Fakultas Farmasi, Universitas Perintis, Padang, Indonesia

*Email : dizasartika@gmail.com

Detail Artikel

Diterima : 30 September 2022

Direvisi : 29 Oktober 2022

Diterbitkan : 31 Oktober 2022

Kata Kunci

Bakteri Endofit
Daun Sirih Hutan
16srRNA

Penulis Korespondensi

Name : Diza Sartika
Affiliation : Universitas Perintis
E-mail : dizasartika@gmail.com

ABSTRACT

*Endophytic bacteria are microorganisms found on the surface of tissues that are not harmful to plants and do not harm the plant. Endophytic bacteria also have a short life cycle and can produce the same large amounts of bioactive compounds as their host plants. Forest betel (*Piper aduncum* L.) is one of the plants that is still widely used. This forest betel plant has secondary metabolites of flavonoids, tannins, saponins and alkaloids which have anti-bacterial activity. This study aimed to isolate and test the antibacterial activity of endophytes from forest betel leaf against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria followed by molecular activation using the 16S rRNA gene. The number of endophytic bacteria isolated from forest betel plants was found to be 3 isolates, namely shoot leaves (DP), young leaves (DM) and old leaves (DT). The results of the antibacterial activity test*

*using the Kirby-Bauer method showed that each isolate had inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* test bacteria, namely: DP (12.8 mm), DM (13.5 mm) and DT (12.7 mm). all belong to the weak category. Meanwhile, the test bacteria *Escherichia coli* did not have antibacterial activity. Molecular results showed that the DM isolate species was *Bacillus thuringiensis* strain S38 and Query Coverage 100% and identity 100%.*

A B S T R A K

Bakteri endofit merupakan mikroorganisme yang terdapat di permukaan jaringan yang sifatnya tidak berbahaya bagi tumbuhan dan tidak merugikan tanaman inangnya. Bakteri endofit juga memiliki siklus hidup yang pendek dan dapat menghasilkan senyawa bioaktif dalam jumlah besar yang sama dengan tanaman inangnya. Sirih hutan (*Piper aduncum* L.) merupakan salah satu tanaman yang masih belum banyak pemanfaatannya. Tanaman sirih hutan ini memiliki senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid, tanin, saponin dan alkaloid yang memiliki aktivitas anti bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menguji aktivitas antibakteri, bakteri endofit dari daun sirih hutan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dilanjutkan dengan mengidentifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Jumlah bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari daun sirih hutan didapatkan 3 isolat yaitu daun pucuk (DP), daun muda (DM) dan daun tua (DT). Hasil pengujian uji aktivitas antibakteri dengan metode Kirby-Bauer yang menunjukkan bahwa masing-masing isolat memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* yaitu: DP (12,8 mm), DM (13,5 mm) dan DT (12,7 mm) yang seluruhnya tergolong kategori lemah. Sedangkan terhadap bakteri uji *Escherichia coli* tidak memiliki aktivitas antibakteri. Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa spesies isolat DM adalah *Bacillus thuringiensis* strain S38 dan Query Coverage 100% dan identitas 100%.

PENDAHULUAN

Tanaman sirih hutan (*Piper aduncum* L.) merupakan tanaman salah satu tanaman endemik. Tanaman sirih hutan masih belum dimanfaatkan secara maksimal. Hal ini, dikarenakan masih sangat jarang penelitian yang mengkaji tentang pemanfaatan sirih hutan (Fitriani, 2017). Sirih hutan merupakan herba yang mudah ditemukan sebagai tumbuhan liar di hutan atau di perkebunan. Tumbuhan ini tidak merambat seperti tanaman sirih lainnya, namun daun dan bunganya mirip sirih sehingga disebut sebagai sirihan (Evizal, 2013).

Menurut penelitian Nunung Safriana dkk (2019) menyatakan bahwa ekstrak tumbuhan sirih hutan (*Piper aduncum* L.) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Strptococcus mutans* pada konsentrasi 30%, 45%, 60%, 75% dengan kontrol positif (*Tetrasiklin hidroklorida* 5%) yang ditandai dengan terbentuknya zona daya hambat disekitar kertas saring. Berdasarkan hasil pengamatan, zona hambat yang paling kecil terdapat pada perlakuan dengan konsentrasi 30% yaitu 11,2 mm sedangkan zona hambat yang paling besar terdapat pada perlakuan dengan konsentrasi 75% yaitu 13,1 mm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun *Pipper aduncum* L. memiliki aktivitas antibakteri disebabkan adanya beberapa golongan senyawa aktif yang bersifat antibakteri antara lain flavonoida, tanin, saponin dan alkaloid. Adanya kandungan senyawa metabolit tersebut yang terdapat pada ekstrak tumbuhan *Piper aduncum* L. dipercaya dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri *Strptococcus mutans*, dengan cara merusak permeabilitas dinding sel bakteri *Strptococcus mutans* atau merusak membran sel bakteri *S. Mutans* (Safriana et al., 2019). Daun sirih hutan (*Piper*

aduncum L.) telah dikenal oleh masyarakat dan mempunyai khasiat dalam penyembuhan luka, menghentikan muntah, mengurangi mual, melancarkan pencernaan, sebagai antiseptik, membunuh bakteri dan jamur serta virus (Novita, 2016).

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 (Safira *et al.*, 2014) Pada umumnya pemanfaatan senyawa bioaktif dari suatu tanaman obat diperoleh dengan cara mengekstrak bagian dari tanaman tersebut tetapi cara ini kurang efektif karena membutuhkan jumlah yang banyak dari bagian tanaman untuk di ekstrak sehingga jika diambil secara terus menerus ketersediaan tanaman di lingkungan akan menurun. Adapun cara yang lebih efektif untuk memperoleh senyawa bioaktif dari tanaman tersebut adalah dengan memanfaatkan bakteri endofit. Pemanfaatan bakteri endofit dari tanaman obat merupakan cara baru untuk mendapatkan senyawa antibakteri tanpa harus mengekstraksi secara langsung dari tanaman obat tersebut (Kusumawati *et al.*, 2014). Keberadaan bakteri endofit di dalam jaringan tanaman diketahui dapat memacu pertumbuhan tanaman dan berperan sebagai agen pengendali hayati. Kemampuan bakteri untuk melakukan penetrasi ke jaringan internal tanaman dapat disebabkan oleh adanya enzim ekstraseluler berupa selulase yang dihasilkan oleh bakteri tersebut (Eliza *dkk.*, 2007). Setelah melakukan penetrasi, bakteri endofit akan berkolonisasi sehingga menghambat pertumbuhan bakteri patogen melalui mekanisme kompetisi ruang dan nutrisi (Pal *et al.*, 2012).

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup dalam jaringan tumbuhan dan bersimbiosis mutualisme dengan inangnya (Kumala *et al.*, 2008). Bakteri endofit dapat memproduksi metabolit sekunder berupa zat bioaktif yang sama dengan tanaman inang (Yandila *et al.*, 2018). Kelebihan produksi zat bioaktif dari mikroorganisme endofit diantaranya, mikroorganisme mudah ditumbuhkan, memiliki siklus hidup yang pendek daripada tanaman dan dapat menghasilkan senyawa bioaktif dalam jumlah besar (Zulkifli *et al.*, 2020). Untuk mengetahui aktivitas bakteri endofit dari daun sirih hutan, maka daun sirih hutan diisolasi untuk mendapatkan bakteri endofit yang terkandung didalamnya. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas anti baktereri dan dilanjutkan dengan identifikasi secara molekuler dengan menggunakan PCR (Polymerase Chain Reaction). PCR yaitu suatu proses reaksi enzimatik in-vitro dengan cara mensintesis molekul DNA menggunakan bantuan enzim serta oligonukleotida sebagai primer dalam suatu *thermocycler* (Mader 2001, dalam Husnaeni 2008).

Berdasarkan penjelasan diatas, peneliti tertarik melakukan penelitian ini dengan tujuan untuk mengisolasi bakteri endofit dari daun sirih hutan dan mengetahui aktivitas antibakteri yang dimilikinya, serta dilakukan identifikasi secara molekuler terhadap bakteri endofit yang memiliki aktivitas antibakteri dengan menggunakan gen 16S rRNA dan alat PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, pada bulan Juni 2022 sampai Agustus 2022.

Alat dan Bahan

Alat

Masker, sarung tangan, erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, timbangan analitik, pisau, cawan petri, jarum ose, pinset, bunsen, lemari pendingin, *laminar air flow*, autoklaf, mikrotube, pipet mikro, jangka sorong, kertas label, plastik *wrap*, *aluminium foil*, tisu, kapas, kasa, mikroskop cahaya, kaca objek, kertas koran, kompor, tabung endorff, tabung spin coloum, termoblock, alat PCR dan alat elektroforesis.

Bahan

Daun sirih hutan, bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, aquades steril, etanol 96%, NaCl 0.9%, 1%, H₂SO₄ 1%, BaCl₂·2H₂O 1,175%, iodin, fuksin, media *Nutrient Agar*, larutan kristal ungu, Na-hipoklorit 5.25%, disk kloramfenikol, lugol, larutan safranin, Primer 16S rRNA Forward (5' CCAGCAGCCGCGGTAATACG3'), Primer 16S rRNA Reverse (3' - ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC5'), gel red, DNA ladder 1 Kbp, loading dye, bubuk agarosa, dan TBE *buffer*.

Prosedur dan Cara Kerja

1. Pengambilan dan Identifikasi Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun sirih hutan dengan 3 kategori yang berbeda yaitu pada daun pucuk (DP), daun muda (DM) dan daun tua (DT) Pengambilan sampel dilakukan di Lubuk Minturun, Kecamatan Koto Tangah, Kota Padang, *Sumatra Barat*. Sampel diidentifikasi di Herbarium Fakultas MIPA Universitas Andalas Padang.

2. Sterilisasi Alat dan Pembuatan Media

a. Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan dicuci dan dikeringkan terlebih dahulu sebelum disterilkan. Cawan petri dibungkus, tabung reaksi dan pipet tetes ditutup mulutnya dengan kapas kemudian dibungkus satu persatu dengan kertas koran. Semua alat disterilkan dalam oven pada suhu 160°C selama 1 jam. Mulut erlenmeyer ditutup dengan kapas dan gelas ukur ditutup dengan kapas dan dibungkus satu persatu dengan kertas koran kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit tekanan 15 lbs, lalu pinset, jarum ose dan kaca objek di sterilkan dengan cara dibakar menggunakan lampu spiritus.

b. Pembuatan *Nutrient Agar*

Medium *Nutrient Agar* dibuat dengan cara melarutkan 20 gr *Nutrient Agar* kedalam 1000 ml aquades steril dalam erlenmeyer. Larutan ini selanjutnya dipanaskan diatas kompor sambil diaduk-aduk selama 10-15 menit, selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3. Isolasi dan Purifikasi Bakteri Endofit dari Daun Sirih Hutan

Sampel daun pucuk (DP), daun muda (DM) dan daun tua (DT) dicuci dengan air mengalir hingga bersih, kemudian sampel disterilisasi permukaan secara bertahap. Sampel

direndam etanol 96% selama 1 menit, dilanjutkan ke dalam Na-hipoklorit 5.25% selama 5 menit, kemudian dibilas lagi ke dalam etanol 96% sebanyak tiga kali. Sampel yang telah disterilisasi kemudian dipotong masing-masing 1-3 cm, lalu ditanam pada media isolasi *Nutrient Agar* kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C dan diamati sampai adanya pertumbuhan koloni. Pemurnian koloni bakteri dilakukan dengan memindahkan 1 ose koloni ke dalam cawan petri yang berisi media *Nutrient Agar* baru dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diperoleh biakan murni, bakteri endofit dipindahkan ke agar miring *Nutrient Agar* (Kusumawati *dkk*, 2014).

4. Identifikasi Bakteri Endofit

a. Identifikasi Makroskopik

Dilihat secara makroskopis bentuk koloni (dilihat dari atas) : berupa titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa kumaran. Permukaan koloni (dilihat dari samping) : rata, timbul- datar, melengkung, membukit, serupa kawah. Tepi koloni (dilihat dari atas) : utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang dan keriting. Warna koloni : keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan, atau hampir bening.

b. Identifikasi mikroskopik (Pewarnaan Gram)

Pengamatan morfologi sel bakteri secara mikroskopik dilakukan dengan pewarnaan gram. 1-2 tetes aquades steril diletakkan di atas kaca objek, koloni bakteri di ambil satu ose dari media diletakkan di atas aquades steril dan sebarkan hingga merata, biarkan olesan tersebut kering karena udara. Setelah olesan benar-benar kering kemudian lakukan kaca objek tersebut beberapa kali di atas nyala api sampai kaca objek terasa agak panas bila ditempelkan pada punggung tangan. Kemudian ditetesi dengan larutan kristal ungu (Gram A), dan didiamkan selama satu menit, kemudian cuci menggunakan aquades pada botol semprot dan dikeringkan. Selanjutnya ditetesi dengan larutan iodium (Gram B) dan dibiarkan selama 2 menit, dicuci menggunakan aquades pada botol semprot dan dikeringkan. Kemudian ditetesi dengan larutan etanol 95% (Gram C) selama 30 detik, dicuci menggunakan aquades pada botol semprot dan dikeringkan. Setelah itu ditetesi dengan larutan safranin (Gram D) atau zat penutup dan didiamkan selama 30 detik, kemudian dicuci menggunakan aquades pada botol semprot dan dikeringkan. Selanjutnya diamati dengan menggunakan mikroskop pada pembesaran kuat (Waluyo, 2010). Indikasi pewarnaannya yaitu bakteri gram positif akan berwarna violet dan bakteri gram negatif akan berwarna merah. Dicatat dan difoto bentuk dari sel bakteri tersebut apakah bulat (coccus), batang (basil), maupun bergelombang (spiral) (Nurhidayati *dkk*, 2015)

5. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Pembuatan Larutan *Mac Farland* 0,5

Larutan H₂SO₄ 1% sebanyak 10 ml dicampurkan dengan larutan BaCl₂·2H₂O 1,175% sebanyak 0,05 mL dalam erlenmeyer. Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang

keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji (Sihombing *dkk*, 2018)

b. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri uji yaitu *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif dan *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang telah diinokulasi diambil ± 1 ose kemudian disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 mL larutan NaCl 0,9% sehingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan *Mac farland* 0,5. Suspensi bakteri tersebut dipipet sebanyak 200 μ L dan di swab ke media pembenihan (Sihombing *dkk*, 2018)

c. Pembuatan Suspensi Isolat Bakteri Endofit

Semua isolat bakteri endofit dari masing-masing sampel diambil dengan jarum ose kemudian masing-masing diinokulasikan kedalam 5 ml NaCl 0,9% kemudian di vortex hingga homogen.

d. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diambil 200 μ L dan diratakan pada permukaan media *Mueller Hinton Agar*. Permukaan media diberi 4 buah kertas cakram yang ditetesi suspensi isolat sebanyak 10 μ L bakteri endofit dari daun pucuk (DP), daun muda (DM) dan daun tua (DT) dan disk kloramfenikol sebagai kontrol positif, kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam dan lakukan 3 kali pengulangan

e. Pengamatan dan Pengukuran Zona Hambat

Pengamatan dilakukan setelah 1 x 24 jam masa inkubasi. Zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram diamati. Diameter zona bening ini kemudian diukur dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona bening diukur berdasarkan penggolongan CLSI.

Tabel 1. Klasifikasi Respon Hambatan Mikroba

Diameter Zona Hambat (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
≤ 14	Lemah
15-18	Sedang
≥ 19	Kuat

Sumber :Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI) ; 2013

6. Identifikasi Bakteri Endofit Terpilih Secara Molekuler

a. Isolasi DNA

Isolat bakteri endofit yang memiliki aktivitas antibakteri di media miring diambil menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam tabung microtube yang telah berisi Pospate Buffer Saline (PBS) sebanyak 1 ml Selanjutnya sampel dalam tabung microtube

dimasukkan ke dalam sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Setelah di sentrifugasi supernatan dibuang lalu ditambahkan sebanyak 1 ml TE buffer kemudian di vortex, selanjutnya di inkubasi dengan heating block selama 10 menit dengan suhu 95⁰C kemudian suspensi bakteri tersebut disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Selanjutnya supernatan dipindahkan ke dalam tabung microtube 1,5 ml, kemudian di simpan ke dalam freezer(Sihombing *dkk*, 2018)

b. Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan PCR

DNA sampel yang telah diisolasi dilanjutkan dengan metode PCR yang terdiri dari 3 tahap denaturasi,anealing, dan extension yang dapat dilihat pada tabel 2, menggunakan primer 16S rRNA. Metode amplifikasi DNA ini digunakan Taq DNA Polymerase menggunakan Go Taq Mastermix.

Tabel 2. Komponen dan campuran untuk primer 16S rRNA dan DNA sampel

Pereaksi	Jumlah pereaksi (µL)
Template DNA	3 µL
Go Taq mastermix	25 µL
Primer forward	1 µL
Primer reverse	1 µL
Nuclease free water	20 µL
Volume total	50 µL

Tabel 3. Siklus mesin PCR

Jumlah Siklus	Temperatur (⁰ C)	Waktu (menit)
1	95	3 menit
35	95(denaturasi)	30 detik
	55(annealing)	30 detik
	72(extension)	30 detik
1	F extension 72	5 menit
1	Cooling 12	Sampai selesai

Tiap – tiap komponen yang dimasukkan kedalam tube PCR. Untuk DNA bakteri dimasukkan terakhir agar tidak terkontaminasi, kemudian dihomogenkan dan dimasukkan kedalam mesin PCR.

c. Elektroforesis Gel Agarosa dan Visualisasi

Gel agarose 1% dibuat dengan melarutkan 0,2 gram bubuk agarose dalam 20 ml TE buffer, kemudian dipanaskan dalam (sop microwave) selama 1-2 menit sampai larut hingga berwarna jernih, lalu tambahkan sebanyak 0,2 µl gel red kemudian tuangkan dalam cetakan *Casting tray* yang telah dipasang sisir. Setelah gel memadat selama ± 30 menit lalu masukkan sampel amplicon produk pcr sebanyak 5 µl. Untuk mengetahui ukuran produk amplifikasi PCR maka dimasukkan sebanyak 3 µl DNA ladder 1Kbp dan 3 µl loading dye pada sumuran gel pertama kemudian diikuti DNA sampel hasil amplifikasi pada sumuran gel berikutnya. Selanjutnya elektroda dihubungkan dengan *power supply* kemudian nyalakan selama 40 menit. Setelah itu alat elektroforesis dimatikan kemudian gel dari alat tersebut diambil lalu di pindahkan kedalam UV-transiluminator untuk dilakukan visualisasi lalu diamati hasilnya dan di dokumentasikan (Sihombing dkk, 2018)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil pemeriksaan identifikasi tumbuhandaun sirih hutan ini memiliki nama spesies *Piper aduncum L.* Sampel diambil dengan tiga kategori yaitu pucuk daun, daun muda, dan daun tua, karena untuk mengetahui daun mana yang menghasilkan bakteri endofit yang mengandung senyawa aktif antibakteri terbesar. Sampel tersebut dilakukan sterilisasi permukaan dengan larutan Na.hipoklorit dan etanol 96% yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran dan mikroorganisme epifit yang menempel pada permukaan sampel, sehingga koloni yang tumbuh pada media isolasi merupakan koloni endofit (Strobel dan Daisy, 2003).

Sampel yang telah disterilisasi di potong 1-4 cm kemudian dilakukan inkubasi di media Nutrient Agar dalam cawan petri, media Nutrient Agar dipilih karena didalam media ini terdapat nutrien yang merupakan substansi organik dan anorganik yang digunakan sebagai sumber energi untuk mendukung pertumbuhan bakteri (Priharta, 2008). Media diletakkan secara terbalik pada inkubator yang berfungsi untuk menghindari uap air yang memenuhi tutup cawan petri hasil dari penguapan media selama inkubasi (Imawati, 2015). Media yang di simpan dalam inkubator dengan suhu 37°C merupakan suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri dan waktu yang berhasil ditumbuhkan setelah inkubasi yaitu selama 24 jam karena pada waktu tersebut bakteri dimungkinkan telah berada pada fase logaritmik dan eksponensial, karena pada fase tersebut bakteri melakukan pembelahan secara konstan dan jumlah sel meningkat (Ifnawati, 2013).

Setelah bakteri tumbuh kemudian diamati morfologi bakteri endofit. Hasil identifikasi secara morfologi isolat bakteri endofit dilakukan secara makroskopik yang dapat dilihat bentuk koloni dari isolat seperti berbentuk bulat tidak beraturan, timbul datar, berwarna putih/bening. Didapatkan hasil penelitian pada pengamatan morfologi sebagai berikut :

Table 4. Hasil Identifikasi Koloni Bakteri Endofit Daun Sirih Hutan Secar Makroskopik

Kode Isolat	Identifikasi Koloni Bakteri Endofit Secara Makroskopik			
	Bentuk	Permukaan	Tepi	Warna
DP	Tak beraturan	Timbul Datar	Berombak	Putih
DM	Tak beraturan	Timbul Datar	Berombak	Putih
DT	Tak beraturan	Timbul Datar	Berombak	Putih Kekuningan

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi koloni bakteri endofit didapatkan bentuk koloni tidak beraturan, tekstur permukaan timbul datar dan warna putih/putih kekuningan. Menurut Faradiska (2012) karakteristik koloni bakteri endofit yaitu mempunyai bentuk yang bulat, oval, dan pada warna koloni yaitu putih, putih kekuningan, atau kental seperti susu, dan tepian koloni terdapat lekukan seperti gelombang dan menyebar. Setelah dilakukan pengamatan morfologi secara mikroskopik bakteri endofit daun sirih hutan dengan pewarnaan gram di dapat hasil bakteri endofit merupakan bakteri gram positif ditunjukkan dengan koloni berwarna ungu dan berbentuk basil. Warna ungu disebabkan karena bakteri mempertahankan warna pertama, yaitu kristal violet. Perbedaan sifat Gram dipengaruhi oleh kandungan pada dinding sel, yaitu bakteri Gram positif kandungan peptidoglikan lebih tebal jika dibanding dengan Gram negatif (Dewi, 2013). Sedangkan pada bakteri gram negatif ditunjukkan dengan adanya koloni berwarna merah karena bakteri gram negatif memiliki komposisi dinding sel yang sebagian besar tersusun dari lapisan lipid, sehingga pada saat pewarnaan gram kurang dapat mempertahankan zat warna utama terutama saat dicuci dengan alkohol (lipid rusak saat dicuci dengan alkohol) sehingga pori- pori dan dinding sel akan membesar dan menyebabkan terlepasnya kompleks kristal violet yang diserap sebelumnya dan bakteri akan berwarna merah setelah diberikan safranin (Elliwati, 2015)

Tabel 5. Hasil Pengamatan Bakteri Endofit Pada Daun Sirih Hutan Berdasarkan Pewarnaan Gram

Kode Isolat	Pewarnaan Gram	Bentuk
DP	Positif	Basil
DM	Positif	Basil
DT	Positif	Basil

Ket: DP=Daun Pucuk,DM=Daun Muda, DT=Daun Tua

Bakteri endofit kemudian di uji aktivitas antibakterinya, bakteri uji yang digunakan yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Kedua bakteri ini penyebab paling umum dari infeksi. Pada tubuh manusia secara alami terdapat bakteri flora normal yang bermanfaat untuk tubuh namun apabila jumlahnya meningkat dari keadaan normal maka akan

menyebabkan bakteri ini bersifat patogen. Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan flora normal pada kulit manusia, tetapi pada kondisi yang memungkinkan dapat menginfeksi kulit manusia menimbulkan jerawat dan bisul(Hendri, 2008). Sedangkan *Escherichia coli* merupakan bakteriusus normal, pada kondisi tertentu dapat menyebabkan infeksi usus dengan gejala diare karena daya penetrasi yang merusak sel mukosa, kemampuan memproduksi toksin yang mempengaruhi sekresi cairan di usus, serta meningkatkan daya lekat kuman. Penyakit lain yang sering dijumpai disebabkan oleh *Escherichia coli* adalah infeksi saluran kemih (ISK), sepsis, dan meningitis (Brooks, 2001).

Uji aktivitas antibakteridilakukan pada 3 isolat bakteri endofitpada daun dengan kode DP (daun pucuk), DM (daun muda), dan DT (daun tua) yang diuji dengan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan metode difusi menggunakan kertas cakram dengan media Mueller Hinton Agar (MHA). MHA digunakan karena memiliki kandungan nutrisi yang baik untuk kultur kebanyakan bakteri. Pada media MHA yang sudah mengandung bakteri uji diletakkan kertas cakram yang berisi suspensi bakteri endofit dan kloramfenikol sebagai kontrol positif, selanjutnya media tersebut diinkubasi dalam inkubator selama kurang lebih 24 jam pada suhu 37⁰C dengan posisi terbalik yang berfungsi untuk menghindari uap air yang memenuhi tutup cawan petri hasil dari penguapan media selama inkubasi (Imawati, 2015)

Tabel 6. Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Bakteri Endofit Daun Sirih Hutan

Kode isolat	Diameter zona bening (mm)							
	<i>S.aureus</i>			Rata-rata	<i>E.coili</i>			Rata-rata
	pengulangan				Pengulangan			
	1	2	3	1	2	3		
DP	12,9	13,1	12,5	12,8	0	0	0	0
DM	13,8	13,7	13,2	13,5	0	0	0	0
DT	12,9	13,2	12,2	12,7	0	0	0	0
Kontrol Positif	20,35			20,35	15,45			15,45

Setelah 24 jam, di ukur diameter daerah bening pada kertas cakram yang menunjukkan potensi daya hambat dari bakteri endofit terhadap bakteri uji tersebut. Dari hasil pengukuran rata-rata diamter zona hambatnya, daya antibakteri dengan DP (12,8 mm), DM (13,5 mm), DT (12,7 mm) termasuk kategori lemah pada bakteri *Staphylocococus aureus*, sedangkan pada bakteri *Escherichia coli* tidak terdapat zona bening. Menurut *Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI)*, respon hambatan lemah ketika diameter zona hambat antibakteri ≤ 14 mm, respon hambatan sedang ketika diameter zona hambat antibakteri 15-18 mm, respon hambatan kuat ketika diameter zona hambat antibakteri ≥ 19 mm.

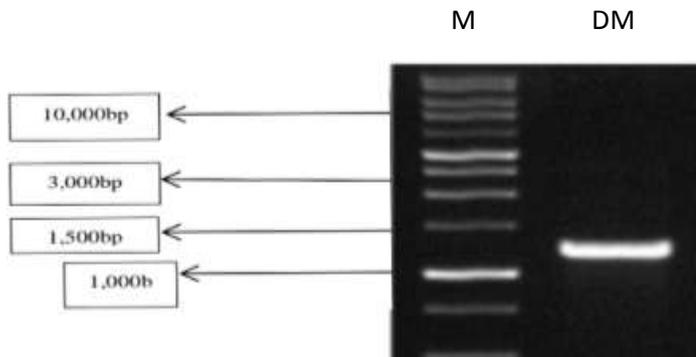
Zona bening yang paling besar didapat pada isolat DM. Dapat dilihat diantara isolat-isolat yang ada bahwa isolat dengan DM memiliki aktivitas antibakteri yang cukup besar dibandingkan dengan isolat DP dan DT. Dari ketiga sampel diketahui bahwa bakteri dengan kode isolat DP, DM, dan DT seluruhnya memiliki daya antibakteri yang lemah terhadap *Staphylococcus aureus* karena menunjukkan zona bening di area kertas cakram, terbentuknya zona bening menunjukkan bahwa bakteri endofit tersebut menghasilkan senyawa bioaktif seperti yang dihasilkan tanaman sirih hutan yaitu senyawa alkaloid, tanin, flavanoid dan terpenoid yang bersifat sebagai antibakteri. Perbedaan diameter zona bening juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan bakteri uji yang berlebihan, sehingga pengaruh metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri endofit tidak signifikan terhadap bakteri uji.

Mekanisme penghambatan pertumbuhan bakteri oleh metabolit sekunder dapat terjadi melalui penghambatan pembentukan senyawa penyusun dinding bakteri, peningkatan permeabilitas membran sel, sehingga sel kehilangan komponen penyusun sel. (Sepriana dkk, 2017). Dari perhitungan rata-rata, diameter zona hambat yang dihasilkan isolat bakteri endofit lebih besar menghambat pertumbuhan bakteri Gram Positif *Staphylococcus aureus*, karena struktur dinding sel yang menyebabkan kedua jenis bakteri tersebut memberikan respon yang berbeda sehingga menunjukkan bakteri dengan kode isolat DM memiliki nilai perhitungan rata-rata diameter zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan isolat kode DP, dan DT.

Isolat bakteri dengan kode DM (Daun Muda) yang memiliki daya hambat terbesar dilanjutkan untuk identifikasi molekuler dengan menggunakan Gen 16S rRNA untuk mengetahui jenis bakteri tersebut. Dalam proses identifikasi molekuler mikroorganisme terdapat 4 proses utama yaitu isolasi DNA, PCR, elektroforesis, dan Sequencing. Proses isolasi DNA menggunakan metode boiling yang merupakan metode isolasi sederhana dengan memberikan gangguan fisik terhadap sel bakteri berupa pemanasan dengan suhu tinggi (95⁰-100⁰C). Pemanasan dengan suhu tinggi dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel sehingga mengakibatkan masuknya cairan dan molekul di sekitar sel dan keluarnya materi-materi dari dalam sel, kemudian DNA dipisahkan untuk selanjutnya digunakan sebagai DNA dalam proses PCR (Afif, 2019)

Tahap berikutnya yaitu elektroforesis DNA yang merupakan suatu teknik yang mengukur laju perpindahan partikel-partikel bermuatan dalam suatu medan listrik (Gaffar, 2007). Hasil dari proses ekstraksi dan PCR kemudian dielektroforesis selama 30 menit dengan voltase 100 pada gel agarosa dengan konsentrasi 1 %. Dari hasil elektroforesis diketahui terdapat benak yang terseparasi dan sejajar dengan marka 1300 bp. Hal ini mengindikasikan bahwa fragmen gen yang teramplifikasi memiliki ukuran ±1300 bp yang sesuai dengan ukuran nukleotida dari gen 16S rRNA yaitu sekitar 1500 bp (Rinanda, 2011)

Dimana hasil dari elektrofoteris dari isolat AT 2 didapatkan hasil sebagai berikut:



Gambar 1. Hasil Elektrofotesis dari Produk Amplifikasi Gen 16S rRNA isolat bakteri endofit Daun muda (DM) dengan ukuran pita DNA ± 1,300bp dengan ukuran pita DNA ±1300bp (DNA marker) 1 kb DNA ladder.

Hasil elektroforesis DM (Daun Muda)diketahui terdapat pita yang teseparasi dan sejajar dengan marker sekitar 1.300 bp. Hal ini mengindikasikan bahwa fragmen gen yang terimplikasi dengan ukuran ± 1,300bp, sehingga dapat disimpulkan bahwa proses amplifikasi bakteri berhasil dilakukan. Selanjutnya isolat dideterminasi dengan menggunakan sekuen 16S rRNA yang dianalisis secara lengkap di 1st BASE Singapura melalui PT. Genetika Science. Pada sekuen tersebut dilakukan dengan program BLAST-N (Basic Local Aligment Search Tool-Nukelotida). Hasil analisis BLAST dari isolat DM seperti pada gambar berikut :

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E-value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Bacillus thuringiensis strain 333-103 ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus thuringiensis	1502	1502	100%	0.0	100.00%	1488	GN208822.1
Bacillus cereus strain BA27FC1-103 ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	1502	1502	100%	0.0	100.00%	1485	GN295136.1
Bacillus thuringiensis strain SET-1 ribosomal RNA gene, complete sequence	Bacillus thuringiensis	1502	21834	100%	0.0	100.00%	837395	CP385420.1
Bacillus thuringiensis strain F12 ribosomal RNA gene, complete sequence	Bacillus thuringiensis	1502	20940	100%	0.0	100.00%	8264749	CP085106.1
Bacillus subtilis strain BCD093-103 ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	1502	1502	100%	0.0	100.00%	1422	GN779385.1
Bacillus subtilis strain PC1-103 ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	1502	1502	100%	0.0	100.00%	1461	GN534342.1
Bacillus cereus strain D56T ribosomal RNA gene, complete sequence	Bacillus cereus	1502	21812	100%	0.0	100.00%	832298	CP382710.1
Bacillus thuringiensis strain CPC-23-85-103 ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus thuringiensis	1502	1502	100%	0.0	100.00%	1443	GN16334.1
Bacillus thuringiensis strain CPC-24-V11-103 ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus thuringiensis	1502	1502	100%	0.0	100.00%	1484	GN16326.1
Bacillus cereus strain D5C-19-02-19-103 ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	1502	1502	100%	0.0	100.00%	1481	GN16215.1
Bacillus albus strain OTM22-103 ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus albus	1502	1502	100%	0.0	100.00%	1486	GN16248.1
Bacillus albus strain OFK31-103 ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus albus	1502	1502	100%	0.0	100.00%	1486	GN16232.1
Bacillus albus strain OTM11-103 ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus albus	1502	1502	100%	0.0	100.00%	1486	GN16238.1
Bacillus albus strain OTM14-103 ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus albus	1502	1502	100%	0.0	100.00%	1448	GN16218.1

Gambar 2. Hasil Analisis BLAST dari Isolat Bakteri Endofit AT 2

Analisis BLAST dilakukan dengan tujuan untuk membandingkan hasil yang diperoleh dengan hasil sekuen DNA dari seluruh dunia yang didepositkan pada database Gen Bank. Informasi dari hasil BLAST tersebut berupa Query Coverage dan Maximum identity. Query coverage adalah persentasi dari panjang nukleotida yang selaras dengan database yang terdapat pada BLAST. Maximum identity adalah nilai tertinggi dari persentasi identitas atau kecocokan antara sekuen query dengan sekuen database yang tersejajarkan. Setelah sekuens

sampel DM dicocokkan dengan sekuens database pada BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yang diakses secara online melalui website NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Maka diperoleh hasil bahwa isolat DM yaitu *Bacillus thuringiensis* strain S38 16S ribosomal RNA, Dimana isolat DM memiliki tingkat kesamaan panjang nukleotida pada database di BLAST mencapai 100% dan memiliki kecocokan sekuens mencapai 100% dengan *Bacillus thuringiensis* strain S38 16S ribosomal RNA. menurut Akihary (2020) Apabila homologi sekuen 16S rRNA menunjukkan <97,5 % dapat dikatakan sebagai spesies yang berbeda atau novel spesies dan dikatakan satu spesies apabila kemiripan yang dimiliki adalah 99%.

SIMPULAN

1. Bakteri endofit dari daun sirih hutan (*Piper aduncum L*) dapat diisolasi dan memiliki 3 isolat bakteri yaitu 1 isolat dari daun pucuk (DP), 1 isolat daun muda (DM) dan 1 isolat daun tua (DT).
2. Isolat bakteri endofit dari daun sirih hutan menunjukkan adanya kemampuan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan daya hambat rendah, dan pada bakteri *Escherichia coli* seluruhnya tidak mempunyai daya hambat. Serta identifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA dilakukan pada isolat bakteri yang memiliki aktivitas antibakteri terbesar yaitu bakteri endofit DM dengan *Bacillus thuringiensis* dengan strain S38 dan Query Coverage 100% dan identitas 100%.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai penuh oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Kemendikbudristek Anggaran Tahun 2022.

DAFTAR PUSTAKA

- AfifR. 2019. *16S rRNA Gene Amplification Of Endophytic Bacteria Which Produces Antimicrobial Compounds*. Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences : Universitas Negeri Padang
- Brooks,G. F., J. S. Butel, S. A. Morse, 2001. *Mikrobiologi Kedokteran. Diterjemahan Oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga*. Edisi Pertama. Jakarta: Salemba Medika.
- CLSI, 2013. M100-S23 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standarts Institute, 33(1).
- Dewi, A.K. 2013. *Isolasi, Identifikasi dan Uji Sensitivitas Staphylococcus aureus terhadap Amoxicillin dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis di Wilayah Girimulyo, Kulonprogo*. Yogyakarta. J. Sain Vet., 31(2), 140-141.
- Evizal, Rusdi. 2013. *Tanaman Rempah dan Fitofarmaka*. Lampung : Lembaga Penelitian Universitas Lampung. Vol.1:20

- Eliza, Munif A, Djatnika I, Widodo. 2007. *Karakter fisiologis dan peranan antibiosis bakteri perakaran Graminae terhadap Fusarium dan pemacu pertumbuhan tanaman pisang. J Hort.* 17:150-160.
- Elliwati, H. 2015. *Peranan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) terhadap perkembangan ilmu pengetahuan.* Fakultas Kedokteran: Universitas Sumatera Utara
- Faradiska, W. 2012. *Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Endofit Dari Akar Tanaman Kentang (Solanum Tuberosum L.) Menggunakan Primer Penanda Rapd.* Skripsi. Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim : Malang
- Gaffar S. 2007. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul.* Bandung : Universitas Padjajaran.
- Hendri, 2008. *Uji Aktivitas Antibakteri Madu Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus*, <http://hendriaptwordpress.com/2008/11/14/uji-aktivitas-antibakteri-madu-terhadap-bakteri-staphylococcus-aureus/>. Diakses tanggal 30 Desember 2010.
- Husnaeni A. 2008. *Variasi genetik jati pada hutan tanaman di Jawa berdasarkan penanda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)* [skripsi]. Bogor: Departemen Silviculture, Fakultas Kehutanan. Institut Pertanian Bogor.
- Imawati R. 2015. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dari Rimpang Temulawak (curcuma xanthorrhiza) sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri Pseudomonas aeruginosa dan Staphylococcus epidermidis.* Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Kusumawati D.E., Fachriyan H.P., Maria B. 2014. *Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit dari Tanaman Miana (Coleus scutellarioides L. Benth.) terhadap Staphylococcus aureus dan Escherichia coli.* Journal Current Biochemistry. 1(1): 45-50.
- Kumala, S., Mangunwardoyo, W., & Arvyna, H. (2008). *Fermentasi goyang dan diam isolat bakteri endofit buah makassar (Brucea javanica L. Merr) dan uji aktivitas antimikrobanya.* *Prosiding Kongres Ilmiah XVI ISFI. Yogyakarta: Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia.*
- Novita, W., 2016. *Uji Aktivitas Fraksi Daun Sirih Hutan (Pipper Betle L) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Streptococcus mutans Secara Invitro.* Jurnal Kedokteran dan Kesehatan, 4(2):141-154
- Nurhidayati, S, Fatturrahman, Ghazali, M. 2015. *Deteksi Bakteri Patogen Yang Berasosiasi Dengan Kappaphycus Alvarezii (Doty) Bergejala Penyakit Ice-Ice.* Jurnal Sains Teknologi & Lingkungan, Vol. 1 No. 2
- Sihombing, M. C. H., Simbala, H. E. I., & Yudistira, A. (2018). *Isolasi Identifikasi Secara Molekuler Menggunakan Symbion Endofit Alga Padina sp.* 7(2) : 41–52.
- Sjafaraenan, S., Lolodatu, H., Johannes, E., Agus, R., & Sabran, A. (2018). *Profil Dna Gen Follicle Stimulating Hormone Reseptor (Fshr) pada Wanita Akne dengan Teknik Pcr dan Sekuensing Dna.* BIOMA: JURNAL BIOLOGI MAKASSAR, 3(1), 1–11.
- Strobel GA, and Daisy B. 2003, *Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products.* *Microbiol. and Mol. Biology Rev.* 67(4):491-502.

- Sepriana C, Jekti DSD. 2017. *Bakteri Endofit Kulit Batang Tanaman Cengkeh (Syzygium Aromaticum L.) Dan Kemampuannya Sebagai Antibakteri*. Jurnal Penelitian Pendidikan Ipa, 3(2).
- Pal A, Chattopadhyay A, Paul AK. 2012. Diversity and Antimicrobial Spectrum of Endophytic Bacteria Isolated from *Peaderi foetida L*. *Int J Curr Pharm Res*. 4:123-127.
- Priharta, A.A. 2008. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dalam Batang Tanaman *Artemisia Annuua L*. Yang Diuji Potensi Antibakterinya Terhadap *Escherichia coli* dan *Staphilococcus aureus*. *Skripsi*. Fakultas Farmasi. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
- Rinanda T. 2011. Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*.;11(3):172-177.
- Utomo SB, Fujiyanti M, Lestari WP, Mulyani S. 2018, *Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa C-4-Metoksifenilkaliks[4] Resorsinarena Termodifikasi Hexadecyltrimethylammonium-Bromide Terhadap Bakteri Staphylococcus Aureus Dan Escherichia Coli*. Jkpk (Jurnal Kimia Dan Pendidikan Kimia). 3(3): 201-209
- Waluyo, L..2010. *Teknik Metode Dasar Mikrobiologi*. UMM Press. Malang
- Yandila, S., Putri, D. H., & Fifendy, M. (2018). Kolonisasi Bakteri Endofit pada Akar Tumbuhan Andaleh (*Morus macraura* Miq). *Bio-Site*, 4(2), 61–67. <https://online-journal.unja.ac.id/BST/issue/view/771>
- Zulkifli, L., Jekti, D. S. D., Lestari, N., & Rasmi, D. A. C. (2020). Isolasi bakteri endofit dari sea grass yang tumbuh di kawasan pantai pulau lombok dan potensinya sebagai sumber antimokroba terhadap bakteri patogen. *Jurnal Biologi Tropis*, 16(2).