

## DNA Barcoding of Endophytic Bacteria from The Stems of Tissue *Piper crocatum* and Activity Anti-Bacterial Properties

Lalu Wira Zain Amrullah<sup>1\*</sup> & Lalu Zulkifli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Primary School Education Program, University of Mataram, Mataram, Indonesia;

<sup>2</sup>Biology Education Study Program, University of Mataram, Mataram, Indonesia;

### Article History

Received : September 02<sup>th</sup>, 2022

Revised : October 20<sup>th</sup>, 2022

Accepted : November 10<sup>th</sup>, 2022

\*Corresponding Author:

**Lalu Wira Zain Amrullah,**

Universitas Mataram, Mataram,  
Indonesia;

Email:

[l.wirazainamrullah@unram.ac.id](mailto:l.wirazainamrullah@unram.ac.id)

**Abstract:** Secondary metabolites from herbal are commonly used to treat disease due to infection from pathogenic bacteria, endophytic bacteria is shortcut to collect secondary metabolites more effective than extracting direct from the plant. This research aims to obtain endophytic bacterial isolates from the stems of the red betel plant which can be used as an inhibitor for the growth of pathogenic bacteria. The method of this research is exploratory descriptive experiment based research. The stages of this research consist of few techniques which are isolation of endophytic, antibacterial examination, morphological, physiological, and biochemical observation, DNA bacterial extraction, gel electrophoresis. To analyse DNA Barcoding using 16S rRNA gen, BLAST and MEGA 10. The results of the antibacterial activity of the isolates showed by clear zone formation against pathogenic bacteria such as *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. aureus*. Endophytic bacterial that successfully isolated are labelled (BSM1, BSM2, BSM3 and BSM4). Based on of the Gel electrophoresis shows that four endophytic bacterial isolates are positive by appearance of bands in 1324bp. Based on the results of the phylogenetic tree it can be concluded that BSM1 is closely related to *Bacillus cereus* JL with a genetic distance of 0.007, while the genetic distance of BSM2 was 0.012, BSM3 0.006 and BSM4 0.003, all three were closely related to *Bacillus pumilus* AUEC29.

**Keywords:** DNA Barcoding, endophytic bacteria, Red Betel Stem.

### Pendahuluan

Pemanfaatan tanaman herbal sebagai bahan baku obat menjadi sebuah terobosan yang populer dan telah berlangsung secara turun temurun. Salah satu jenis tanaman herbal yang cukup familiar dimanfaatkan sebagai bahan baku obat herbal adalah tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav). Tanaman sirih merah banyak dimanfaatkan sebagai obat untuk mengatasi penyakit terutama yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen. Tanaman sirih merah termasuk kedalam jenis tanaman menjalar dengan ciri batang berwarna hijau tua sampai kemerahan, bersulur dan beruas dengan tiap buku ditumbuhi bakal akar, daun bertangkai membentuk jantung, permukaan daun bagian atas berwarna hijau gelap dan bagian bawah berwarna

merah hati sampai keunguan, memiliki aroma yang khas seperti aroma sirih (Sudewo, 2005).

Sebagai tanaman herbal, tanaman sirih memiliki kandungan berupa senyawa metabolit sekunder seperti *flavonoid*, *alkaloid*, *tanin*, *saponin*, *hidroksikaficol*, *polifenol*, *kavicol*, *kavibetol*, *allylprokatekol*, *karvokrol*, *minyak astsiri*, *eugenol*, *cineole*, *coryofelen*, *kadimen*, *ekstragol*, *terpena*, *steroid*, *P-cymene* dan *fenil propoda*. (Kristiningrum & Meymurti, 2012:14). Beberapa senyawa metabolit sekunder dapat berfungsi sebagai antimikroba, hal ini diperkuat berdasarkan penelitian yang dirangkum oleh Yu *et al.*, (2010), bahwa kandungan senyawa pada tanaman seperti komponen *Aliphatic*, *Alkaloid*, *Flavonoid*, *Peptide*, *Phenol*, *Quinon*, dan *Terpenoid*, memiliki fungsi sebagai antimikroba.

Mendapatkan senyawa metabolit sekunder dapat melalui proses ekstraksi yang umum

dilakukan. Proses ekstraksi dapat melibatkan sebagian atau seluruh bagian dari tanaman dan membutuhkan waktu yang cukup lama. Seiring dengan perkembangan teknologi, pengambilan senyawa metabolit sekunder melalui proses ekstraksi dapat dipersingkat melalui pemanfaatan bakteri endofit. Menurut Hallman & Berg (2006); Bonet *et al.*, (2012) bahwa bakteri endofit dapat ditemukan hidup endofit di dalam jaringan tanaman. Bakteri endofit membentuk hubungan yang erat dengan tanaman induknya berupa simbiosis mutualisme.

Hubungan ini memberi keuntungan tanaman dalam memperkuat perlindungan terhadap serangan patogen melalui induksi ketahanan tanaman yang dikenal dengan *induced systemic resistance* (ISR), sementara itu bakteri endofit mendapatkan nutrisi dari tanaman inangnya sebagai sumber energi dalam menjalankan siklus hidupnya. Berbagai jenis tanaman herbal yang telah teridentifikasi dan tersebar dipermukaan bumi diketahui mengandung satu atau lebih mikroorganisme endofit (Strobel & Daisy, 2003).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, mengenai kemampuan tanaman sebagai bahan obat, seperti halnya tanaman sirih hijau dikenal sebagai tanaman obat tradisional yang mengandung senyawa metabolit sekunder dan berperan sebagai antibakteri (Sadiyah, *et al.* 2022). Penelitian senada terkait kemampuan tanaman dalam menghasilkan senyawa anti bakteri pernah dilakukan pada tanaman sirih merah dimana dapat diketahui bahwa senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman sirih merah memiliki aktivitas senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Oktaviani *et al.* 2022).

Untuk mempercepat proses pengambilan senyawa metabolit sekunder yang dimiliki tanaman sirih hijau digunakanlah pendekatan menggunakan bakteri endofit, seperti pada penelitian Shafira, Pasaribu & Bintang (2014), fokus meneliti tentang aktifitas daya hambat bakteri endofit tanaman sirih hijau dan berhasil mendapatkan 3 isolat yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri dan telah diuji terhadap pertumbuhan *S. aureus*. Penelitian terkait pemanfaatan bakteri endofit dari bagian batang tanaman sirih merah dalam memperoleh senyawa metabolit sekunder dan sebagai solusi

menghasilkan senyawa antibakteri belumbanyak dilakukan.

Selain bertujuan untuk mengetahui aktifitas antibakteri, penelitian ini juga menekankan pada tahap identifikasi molekuler atau DNA Barcoding guna untuk memproleh informasi kekerabatan berdasarkan phylogenetic tree dari bakteri endofit yang berhasil diisolasi. Informasi kekerabatan isolat bakteri endofit tanaman sirih merah dengan bakteri referensi dapat dimanfaatkan sebagai penambahan bahan informasi ilmiah.

## Bahan dan Metode

### Isolasi dan Pengujian Daya Hambat

Media yang digunakan dalam melakukan isolasi adalah media TSA. Tahapan yang dilakukan sebagai berikut: (a) Persiapan bahan. Batang sirih merah dipotong dengan ukuran  $\pm 5$  cm; (b) Sterilisasi permukaan bahan. Batang sirih merah disterilisasi dengan direndam pada larutan natrium hipoklorit 2% selama 3 menit selanjutnya direndam ke dalam larutan alkohol 70% selama 2 menit dan terakhir dibersihkan menggunakan aquades steril dengan cara dialiri; (c) Penanaman sampel pada media TSA. Batang sirih merah diiris tipis, irisan ditempatkan di atas media TSA dan diinkubasi pada suhu 32°C selama 48 jam.

Koloni bakteri yang tumbuh di sekitar tepian batang sirih merah selanjutnya disubkultur dengan metode *streak plate* di media TSA yang baru dan diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Untuk mengetahui bentuk sel bakteri yang tumbuh dilakukan pengecatan Gram (Nazifah, Rustini, & Darwin, 2013). Proses ini dilakukan berulang sampai menghasilkan satu koloni bakteri dalam bentuk isolat murni, selanjutnya isolat murni bakteri endofit dipindahkan ke dalam media *Nutrien Agar slant tube* dan disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan. Tahapan selanjutnya, isolat bakteri endofit diidentifikasi secara morfologi berdasarkan, elevasi koloni, bentuk tepian koloni, warna koloni dan ada tidaknya pembentukan spora.

### Karakterisasi Fisiologi Biokimia Isolat

Uji yang dilakukan untuk karakterisasi fisiologi biokimia isolat adalah uji motilitas, uji katalase, uji indol, uji hidrolisis urea, uji simon sitrat, uji *metil red – voges proskauer* (mr-vp),

(Nazifah *et al.* 2013). uji hidrolisis pati, uji fermentasi karbohidrat, Uji TSIA (Sardiani *et al.* 2015)

### Identifikasi Molekuler Isolat

Tahapan identifikasi molekuler isolat bakteri endofit dilakukan dengan cara sebagai berikut: (a) Ekstrak DNA. Untuk ekstraksi DNA, mengikuti prosedur Kit DNA-Zol. Hasil sentrifugasi berupa pelet dikeringkan pada suhu kamar, kemudian ditambah aquades 50µl dan disimpan pada suhu -20°C sampai saat digunakan. (b) Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR. Primer universal 16S rRNA yang digunakan adalah primer 63f (5' -CAG GCCTAACACATG CAA GTC- 3') dan 1387r (5'-GGGCGGCGTGTACAAGGC-3') (Marchesi *et al.*, 1998). PCR dilakukan dengan cara memasukkan 1 µl template DNA, 1 µl primer 63f, 1 µl primer 1387r dan 17 µl aquades ke dalam tabung PCR, selanjutnya amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan alat my cycler (BioRad). Kondisi awal (pre) PCR diatur pada suhu 94°C selama 5 menit, kemudian diikuti dengan 35 siklus PCR yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* primer pada suhu 55°C selama 30 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 45 detik. Setelah 35 siklus dilalui, selanjutnya dilakukan post PCR pada suhu 72°C selama 5 menit dan disimpan pada suhu 20°C (Sepriana *et al.*, 2020). (c) Elektroforesis. Pada tahap elektroforesis, sebanyak 4 µl produk PCR dielektroforesis pada 2% gel agarose dalam buffer TBE (0,5TBE) yang telah diisi sebanyak 4µl EtBr. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 V dan kuat arus sebesar 400 A selama 30 menit. Marker yang dipakai adalah 100 bp DNA ladder. Hasil elektroforesis divisualisasi dibawah sinar

ultraviolet dan difoto dengan menggunakan *GelDoc*. (d) Sekuensing produk PCR. Produk PCR yang diperoleh selanjutnya disekuensing di 1<sup>st</sup> Base Malaysia melalui PT Genetika Science Jakarta. (f) Phylogenetic Tree. Proses pembuatan phylogenetic tree dalam bentuk Dendogram dihasilkan melalui program BLAST dengan bakteri referensi diperoleh dari Genbank.

### Teknik Analisis Data

Teknik pengumpulan data penelitian dapat diperoleh dari pengamatan karakteristik morfologi, fisiologi biokimia isolat. Data sekuen dianalisis menggunakan software MEGA 10 dan BLAST selanjutnya data sekuen disesuaikan berdasarkan referensi sekuen database Genbank yang diakses pada situs NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

### Hasil dan Pembahasan

#### Isolasi Bakteri Endofit Batang Sirih Merah

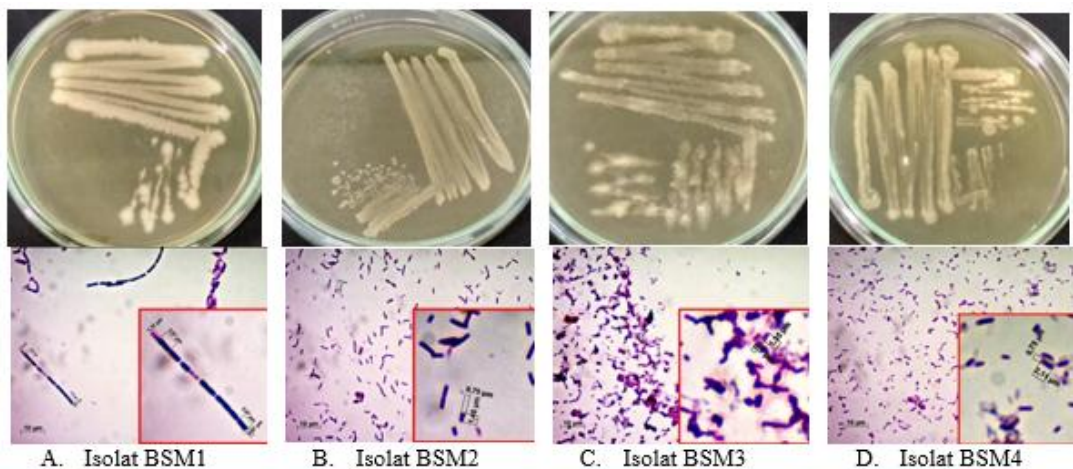
Isolasi bakteri endofit dari batang sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) berhasil diperoleh 4 isolat yang diberi kode (BSM1, BSM2, BSM3 dan BSM4) dengan ciri morfologi koloni berbentuk bulat, tepian rata, bentuk elevasi dari BSM1, BSM2, BSM3 berbentuk cembung dan untuk elevasi dari BSM4 berbentuk datar. Pigmentasi dari BSM1 dan BSM4 berwarna krem, permukaan basah, mengkilat. BSM2 berwarna krem, permukaan kasar dan untuk BSM3 berwarna krem dengan permukaan basah. Saat pengamatan morfologi sel diketahui semua isolat berbentuk basil membentuk spora dan merupakan bakteri gram positif (+). Hasil pengamatan ditampilkan pada **Gambar 1** dan dideskripsikan pada **Tabel 1**.

**Tabel 1.** Morfologi koloni dan sel isolat bakteri endofit batang tanaman sirih merah

Kode Isolat	Morfologi Koloni				Gram	Morfologi Sel	
	Pigmentasi	Bentuk	Tepian	Elevasi		Bentuk	Pembentukan Spora
BSM1	Krem, Basah Megkilat	Bulat	Rata	Cembung	Positif	Bacil (Berantai)	+
BSM2	Krem, Kering	Bulat	Rata	Cembung	Positif	Bacil (Tunggal)	+
BSM3	Krem, Basah	Bulat	Rata	Cembung	Positif	Bacil (Pagar)	+

Kode Isolat	Morfologi Koloni				Gram	Morfologi Sel	
	Pigmentasi	Bentuk	Tepian	Elevasi		Bentuk	Pembentukan Spora
BSM4	Krem, Basah, Mengkilat	Bulat	Rata	Datar	Positif	Bacil (Tunggal)	+

**Keterangan:** BSM (Batang Sirih Merah)



**Gambar 1.** Isolat bakteri endofit batang tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav). **Keterangan:** Ciri morfologi koloni isolat ditunjukkan pada gambar atas dan ciri morfologi sel ditunjukkan pada gambar bawah.

### Pengujian Anti-Bakteri Isolat Bakteri Endofit

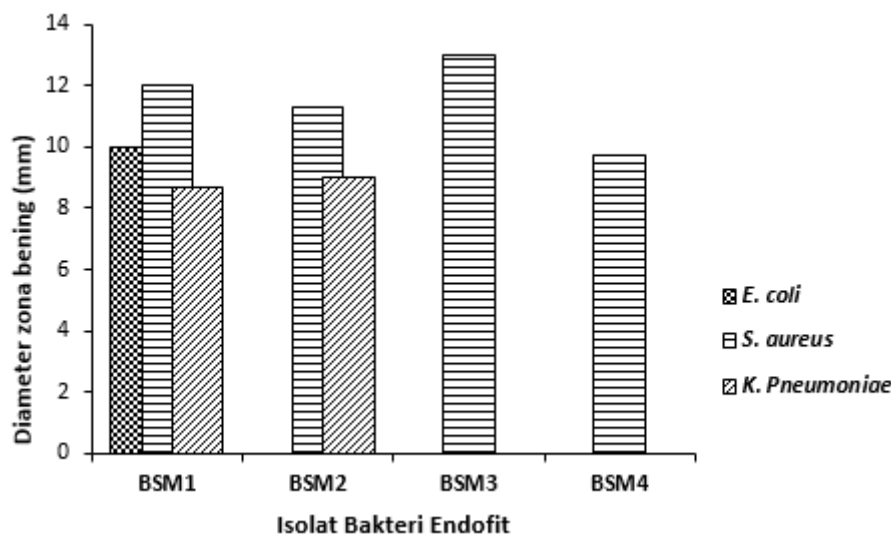
Isolat bakteri endofit selanjutnya diuji daya hambat terhadap bakteri uji untuk mengetahui potensinya sebagai anti bakteri. Bakteri uji yang digunakan merupakan bakteri isolat klinik seperti; (a) *Escherichia coli*, (b) *Staphylococcus aureus*, dan (c) *Klebsiella pneumoniae*.

Ekstrak isolat bakteri endofit yang memiliki sebagai antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening. Terbentuknya zona bening mengindikasikan kemungkinan adanya senyawa metabolit sekunder yang mampu menghambat pertanaman bakteri patogen (Shafira *et al.*, 2014). Zona bening yang terbentuk di area sumuran menunjukkan adanya aktivitas dari senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri endofit yang berasal dari batang sirih merah. Umumnya antibakteri dapat mempengaruhi pembentukan dinding sel atau permeabilitas membran sel yang berfungsi sebagai bakteriosida, sedangkan yang mempengaruhi sintesis protein dapat berfungsi

sebagai bakteriostatik (Mutschler, 1991). Mekanisme kerja metabolit sekunder dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan cara mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, menghambat sintesis protein bakteri dan merusak sintesis asam nukleat (Brooks *et al.*, 2005).

Grafik daya hambat yang dihasilkan oleh aktifitas bakteri endofit batang sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) terhadap isolat bakteri uji dapat diamati pada **Gambar 2**. Diameter daya hambat yang terbentuk oleh aktifitas isolat bakteri endofit batang sirih merah menunjukkan zona bening terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* dengan daya hambat terbesar dihasilkan oleh isolat BSM3.

Untuk diameter zona bening yang ditunjukkan oleh isolat BSM1 dan BSM2 terhadap pertumbuhan *K. Pneumoniae* dengan zona hambat terbesar dihasilkan oleh isolat BSM2. Sedangkan untuk diameter zona bening terhadap pertumbuhan *E. coli* hanya dapat ditunjukkan oleh aktifitas isolat BSM1.



**Gambar 2.** Grafik hasil pengukuran diameter zona bening ekstrak isolat bakteri endofit batang sirih merah terhadap bakteri uji.

### Karakterisasi Fisiologi dan Biokimia Isolat Bakteri Endofit

Dari hasil uji fisiologi biokimia didapati bahwa; (a) isolat BSM1 pada uji motilitas, uji glukosa, uji sukrosa, uji maltosa, uji hidrolisis pati, uji *metil red* (mr) dan uji katalase menunjukkan hasil positif, (b) isolat BSM2 pada uji TSIA menunjukkan bagian lereng bersifat basa dan bagian dasar bersifat asam (L/d), pada uji glukosa, uji motilitas, uji *metil red-poges proskauer* (mr-vp) dan uji katalase menunjukkan hasil positif, (c) isolat BSM3 pada uji motilitas, uji glukosa dan uji katalase menunjukkan hasil positif, dan (d) isolat BSM4 pada uji glukosa, uji sukrosa, uji maltosa, uji motilitas, uji *metil red* (mr) dan uji katalase menunjukkan hasil positif.

Pada tahapan uji biokimia fisiologis yang ditandai dengan hasil positif menandakan adanya aktifitas yang terjadi antara isolat dengan media uji. Seperti pada uji TSIA isolat bakteri yang menunjukkan perubahan warna media berdasarkan sifat asam dan basa pada bagian lereng dan dasar media (L/d). Media TSIA digunakan untuk membedakan bakteri berdasarkan fermentasi laktosa, sukrosa, glukosa dan produksi hydrogen sulfide (Lehman, 2005).

Uji motilitas pada isolat yang menunjukkan hasil positif ditandai dengan terdapatnya penyebaran pertumbuhan koloni bakteri pada area tusukan, motilitas bakteri yang terjadi umumnya melibatkan *flagella* yang dimiliki oleh bakteri (Shields & Cathcart, 2011).

Uji fermentasi karbohidrat meliputi uji glukosa, uji sukrosa, uji maltosa dan uji laktosa pada isolat yang menunjukkan hasil positif menandakan terjadinya proses fermentasi, proses ini menyebabkan terbentuknya gas yang dapat diamati pada media uji (Sardiani *et al.*, 2015). Uji hidrolisis pati pada isolat yang menunjukkan hasil positif menandakan isolat mampu menghasilkan enzim amilase ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar area koloni bakteri setelah ditetesi beberapa tetes larutan *lugol iodine* (Wahyuni, Lianto, & Khaeruni, 2014).

Uji *metil red* (mr) pada isolat yang menunjukkan hasil positif ditandai dengan perubahan warna pada media dimana warna merah menunjukkan hasil positif dan warna oranye menunjukkan hasil negatif (Hemraj, Diksha, & Avneet, 2013), yang artinya isolat mampu menghasilkan asam-asam campuran dari fermentasi glukosa melalui jalur fermentasi asam laktat, asam sukinat dan asam asetat (Cappuccino & Sherman, 2001).

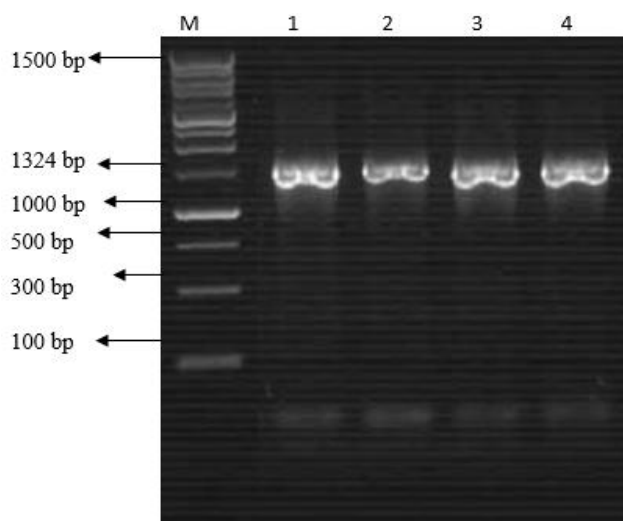
Uji *voges proskauer* (vp) merupakan tes untuk mendeteksi adanya *Asetil-metil carbinol* (*acetoin*) yang merupakan perantara dalam produksi *butilen glikol* yang ditandai dengan adanya perubahan warna media dari kuning menjadi merah yang menunjukkan hasil positif. Pada uji katalase yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim katalase, isolat yang menunjukkan hasil positif ditandai dengan

terbentuknya gelembung udara yang berarti isolat mampu menghidrolisis *hydrogen peroksida* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) menjadi air dan oksigen (Toelle & Lenda, 2014).

### Identifikasi Molekuler Isolat

Isolat bakteri endofit diidentifikasi secara molekuler melalui teknik PCR menggunakan primer universal 63f dan 1387r. Hasil dari

amplifikasi selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa pada tegangan 100 V dan kuat arus 400 A yang diamati di bawah UV transluminator. Hasil elektroforesis dideskripsikan pada **Gambar 3** yang memperlihatkan adanya pita DNA penyandi gen 16S rRNA sejajar pada ukuran ±1324 bp setelah dibandingkan dengan DNA marker (100 bp DNA ladder).



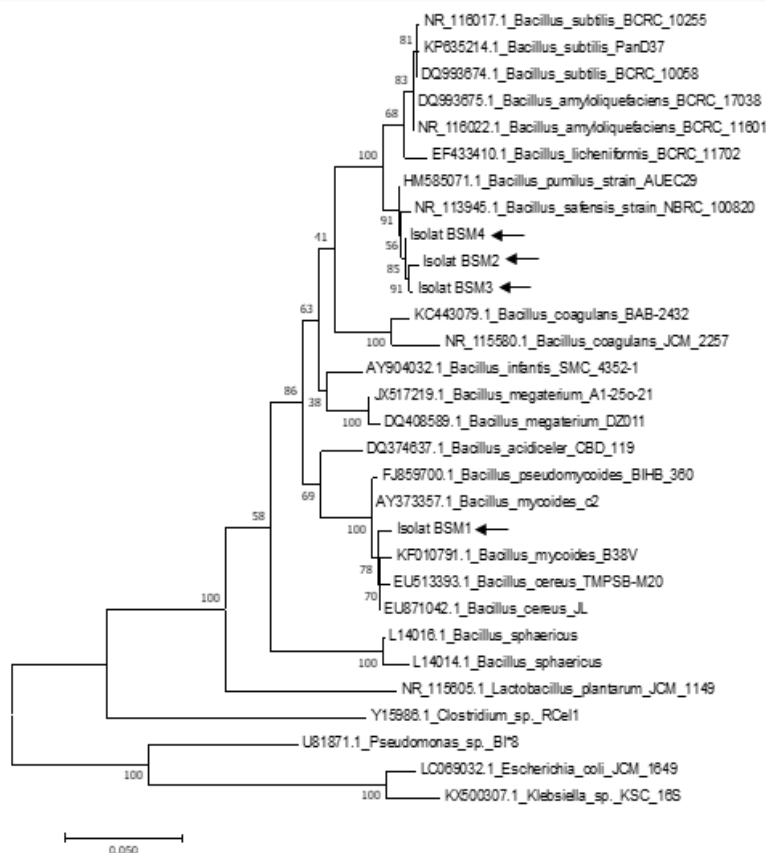
**Gambar 3.** Hasil elektroforesis dari amplifikasi 16S rRNA isolat bakteri endofit batang sirih merah (BSM) dengan ukuran pita DNA ± 1324 bp. **Keterangan:** M: DNA marker 100 bp DNA ladder, 1: BSM1, 2 : BSM2, 3 : BSM3, 4 : BSM4.

Setelah melalui tahap elektroforesis. Selanjutnya isolat diidentifikasi dengan melakukan sekuensing. Kemudian data hasil sekuen gen 16S rRNA dari isolat bakteri endofit batang sirih merah diolah menggunakan program *BLAST* selanjutnya

dibandingkan dengan data base yang ada pada GenBank. Hasil perbandingan sekuens kemudian divisualisasikan dalam bentuk Phylogenetic tree **Gambar 4**. Berdasarkan genetic distance **Tabel 2** menggunakan program MEGA 10.

**Tabel 2.** *Genetic distance* berbasis sekuen gen 16S rRNA isolat bakteri endofit batang sirih merah terhadap bakteri referensi yang diakses dari GenBank.

No	Kode isolat bakteri endofit	Bakteri referensi	Jarak genetik
1	BSM1	<i>Bacillus cereus</i> JL	0.007
		<i>Bacillus mycoides</i> c2	0.009
		<i>Bacillus cereus</i> TMPSB-M20	0.011
2	BSM2	<i>Bacillus safensis</i> strain NBRC100820	0.012
		<i>Bacillus pumilus</i> strain AUUC29	0.009
3	BSM3	<i>Bacillus safensis</i> strain NBRC100820	0.009
		<i>Bacillus pumilus</i> strain AUUC29	0.006
4	BSM4	<i>Bacillus safensis</i> strain NBRC100820	0.006
		<i>Bacillus pumilus</i> strain AUUC29	0.003



**Gambar 4.** Pohon filogenetik berdasarkan sekuen gen 16S rRNA dari isolat bakteri batang sirih merah (BSM1, BSM2, BSM3, BSM4) setelah dibandingkan dengan data yang diakses pada GenBank. (Jukes & Cantor, 1969; Felsenstein, 1985; Saitou & Nei, 1987; Kumar *et al.*, 2016)

Berdasarkan hasil dari pohon filogenetik pada **Gambar 4** bahwa isolat bakteri endofit yang diisolasi dari batang tanaman sirih merah termasuk kedalam genus *Bacillus* yang berada satu kelompok dengan beberapa strain dari spesies tersebut seperti *Bacillus cereus* JL, *Bacillus mycooides* c2, *Bacillus cereus* TMPSB-M20, *Bacillus safensis* strain NBRC100820 dan *Bacillus pumilus* strain AUEC29. Berdasarkan jarak genetik pada **Tabel 2** diketahui bahwa isolat BSM1 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Bacillus cereus* JL pada jarak genetik terdekat 0.007, dan isolat BSM2 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Bacillus pumilus* strain AUEC29 pada jarak genetik terdekat 0.009, dan untuk isolat BSM3 diketahui memiliki kekerabatan terdekat dengan *Bacillus pumilus* strain AUEC29 pada jarak genetik terdekat 0.006 dan isolat BSM4 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Bacillus pumilus* strain AUEC29 pada jarak genetik terdekat 0.003.

Studi filogenetik merupakan salah satu metode yang digunakan dalam sistematika untuk

memahami keanekaragaman makhluk hidup melalui rekonstruksi hubungan kekerabatan (*phylogenetic relationship*). Pohon filogenetik dalam bentuk dendogram yang digunakan untuk menggambarkan hubungan kekerabatan antar taksa yang terdiri atas sejumlah nodus dan cabang dengan hanya satu cabang yang menghubungkan dua nodus paling berdekatan. Setiap nodus yang terbentuk mewakili unit-unit taksonomi, sedangkan cabang mewakili hubungan antar unit yang menggambarkan keturunan dengan leluhur (Syamsul & Prawiradilaga, 2013).

Berdasarkan jarak genetik yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan isolat BSM2, BSM3, BSM4 berkerabat dekat dengan *Bacillus pumilus* strain AUEC29 dapat disimpulkan bahwa ketiga isolat tersebut memiliki variasi jarak genetik terhadap bakteri referensi. Sedangkan untuk isolat BSM1 hanya ditemukan berkerabat dekat dengan *Bacillus cereus* JL.

Beberapa penelitian terkait dengan bakteri referensi yang memiliki hubungan kekerabatan

terdekat dengan isolat bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari batang tanaman sirih merah, seperti penelitian Sunkar & Nachiyar (2012), berhasil mengisolasi bakteri endofit yang diindikasikan sebagai *Bacillus cereus* dari tanaman *Garcinia xanthochymus* (asam kandis) dan memiliki kemampuan mensintesis nanopartikel perak (AgNPs). Bakteri endofitik yang diidentifikasi sebagai *Bacillus cereus* mampu mensintesis nanopartikel perak dengan aktivitas antibakteri potensial terhadap *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* dan *Klebsiella pneumoniae*. Begitu juga dalam penelitian Resti *et al.*, (2013), bakteri endofit yang mampu meningkatkan hasil bawang merah adalah dari kelompok *B. cereus* Se07 (SN2E2), *Serratia mercerscens* PPM4 (ULG1E2) dan *Bacillus sp* SJI (PU2E2).

*Bacillus cereus* merupakan bakteri Gram positif, memiliki ciri warna koloni putih agak krem dan berbentuk batang (bath). *B. cereus* mampu membentuk endospora dengan posisi sentral (Zulkifli, Jekti, & Bahri, 2018). Menurut Holt *et al.*, (1994); Yulvizar (2013), *Bacillus sp.* memiliki sifat Gram positif dan biasanya motil, bentuk endospora oval, terkadang berbentuk bundar atau silinder dan warna koloni berwarna putih susu sampai kekuningan. Ciri utama endospora pada bakteri *Bacillus* yakni memiliki dinding yang tebal dan resisten terhadap kondisi fisik yang kurang menguntungkan (Bai, Mulec, & Smith, 1993). Selain itu *Bacillus cereus* termasuk golongan mikroorganisme mesofilik (Afrizal, Effendi, & Siregar, 2019). Mikroorganisme jenis ini dapat tumbuh pada suhu optimal sekitar 30°C - 35°C. Alat gerak yang dimiliki *Bacillus cereus* berupa flagel.

Penelitian selanjutnya mengenai *Bacillus* yang diisolasi dari jaringan tanaman *Ocimum sanctum* (Ruku-ruku), mengkonfirmasi adanya bakteri berbentuk batang di dalam jaringan tanaman. Bakteri tersebut diidentifikasi sebagai *Bacillus pumilus* dengan analisis biokimia dan sekuen gen 16S rRNA. Analisis *in vitro* menunjukkan bahwa strain *Bacillus pumilus* yang diisolasi memberi banyak karakteristik pertahanan tanaman (PGP) seperti pelarut fosfat dan produksi asam. *Bacillus pumilus* memberikan keunggulan sebagai penghambat patogen. *Bacillus pumilus* menunjukkan kemungkinan sebagai *bioinoculant* untuk meningkatkan pertahanan tanaman dan juga sebagai probiotik (Murugappan, Begum, & Roobia, 2013).

Hal yang serupa dijelaskan pada penelitian Mukherjee *et al.*, (2017) yang berhasil melakukan isolasi bakteri endofit pada tanaman *Ophioglossum reticulatum L* untuk mengetahui potensinya sebagai produksi senyawa antimikroba. Isolat yang memiliki antibakteri paling potensial dicirikan dengan ciri morfologi, fisikokimia dan analisis urutan 16S rRNA, ditemukan isolat bakteri endofitik potensial yang diberi kode OPL19 dan diidentifikasi sebagai *Bacillus safensis* (KY029081). Senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh *Bacillus* OPL19 ditemukan bersifat relatif termostabil, non-polar, dan lipoidal yang menunjukkan spektrum aktivitas yang luas menghambat berbagai bakteri Gram positif dan Gram negatif termasuk *Acinetobacter baumannii*, *B. subtilis*, *Cellulans selulosimikrobium*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*.

Hallmann *et al.*, (2001) menyatakan bahwa strain bakteri endofit dari awal dapat mengkolonisasi jaringan korteks akar dan merangsang pertahanan tanaman. Sifat terpenting bagi bakteri endofit adalah memiliki kemampuan sebagai agen pengendali hayati. Selain itu bakteri endofit dapat meningkatkan pertanaman melalui banyak cara, termasuk aktivitas memproduksi fitohormon IAA (Herlina, Pukan, & Mustikaning, 2016). Schulz, Boyle, & Siebar, (2006) menyatakan bahwa bakteri endofit salah satunya *Pseudomonas spp.* mampu menghambat bakteri patogen dengan menghasilkan zat diantaranya adalah *phenazine*, *phloroglucinols*, *pyoluteorin*, *pyrrolnitrin*, dan *derivative*. Selain itu, bakteri endofit yang telah diidentifikasi yaitu bakteri *Bacillus sp.* Yang berperan menghasilkan antibiotik, seperti; *gramisidin*, *polipeptida-subtilin*, *polimiksin*, *bacitracin*, *fitoaktin* dan *bulbiformin* (Nasrun & Nurmansyah, 2015).

Yu *et al.*, (2010), dalam penelitiannya berhasil merangkum kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan beberapa senyawa antimikroba seperti; *quinones*, *aliphatic*, alkaloid, *flavonoids*, *phenols*, *steroids*, *peptides*, *terpenoids*. Beberapa mikroorganisme menghasilkan zat beracun yang dikenal sebagai toksin. Mikroorganisme menghasilkan toksin yang disekresikan ke medium disekitarnya (eksotoksin) atau disimpan di dalam selnya (endotoksin) sebagai bagian dari sel tersebut. Banyak mikroorganisme terutama bakteri Gram negatif tidak mengekskresikan toksin terlarut dari sel utuh tetapi



menghasilkan endotoksin yang dilepas hanya bila selnya hancur (Dwidjosaputro, 2005).

## Kesimpulan

Tanaman sirih merah merupakan tanaman herbal yang banyak dimanfaatkan dalam bentuk ekstrak langsung untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder. Dengan adanya bakteri endofit yang memiliki hubungan simbiosis mutualisme dengan tanaman sirih merah terutama bakteri endofit pada bagian batang tanaman, berkontribusi besar sebagai penghasil senyawa bioaktif. Pengujian potensi bakteri endofit sebagai penghasil senyawa bioaktif yang berfungsi menghambat pertumbuhan bakteri patogen dibuktikan oleh isolat BSM1, BSM2, dan BSM3 yang menunjukkan pembentukan zona bening terhadap *S. aureus* dengan kategori *Intermediate*, dan BSM4 dengan kategori *Resisten*. Sedangkan pada pengujian daya hambat terhadap pertumbuhan *E. coli* dan *K. pneumonia*, dimana keempat isolat hanya menunjukkan kategori *Resisten*. Berdasarkan indentifikasi molekuler terhadap keempat isolat dan dianalisis jarak genetiknya berdasarkan bakteri referensi pada database Genbank dengan menggunakan program *BLAST* dan *MEGA 10* untuk mendapatkan hasil *Phylogenetic tree* dalam bentuk dendogram diperoleh bahwa isolat BSM2, BSM3, BSM4, berkerabat dekat dengan *Baicillus pumilus*, dan untuk isolat BSM1 berkerabat dekat dengan *Baicillus cereus* JL.

## Ucapan Terima Kasih

Terselesaikannya tulisan ini tak lepas dari kontribusi semua pihak yang membantu. Penulis sampaikan ucapan terima kasih.

## Referensi

Afrizal D., Effendi I. & Siregar Y.I. (2019). Isolation, Identification and Antagonism Test of Heterotrophic Bacteria in Mangrove Plants Against Pathogenic Bacteria (*Bacillus cereus*, *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophilia*, and *Pseudomonas* sp.) *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 24 (1) 61-68. <https://media.neliti.com/media/publications/297795-isolat-ion-identification-and->

[antagonism-eb3d 7845.pdf](#) (Accessed on July 27, 2021)

- Bai, U., Mulec, I.M. and Smith, I. (1993). SinR modulates the activity of SinR, a developmental switchprotein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. *Genes Dev*, 7 (1): 139-148. <https://doi.org/10.1101/gad.7.1.139>
- Bonet, N.G., Arrieta, J.M. Santana, C.N. Duarte, C.M. and Marba, N. (2012). Endophytic Bacterial community of a Mediterranean marine angiosperm (*Posidonia oceanic*). *Frontiers in Microbiology Original Research Article* Vol. 3: 1-16. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00342/full>
- Brooks, Geo F., Butel, Janet S. Morse, Stephen A. Eddy Mudihardi, H. (2005). Mikrobiologi kedokteran (medical microbiology). Jakarta: Salemba Medika, pp: ISBN: 979302706 1. <https://opac.perpusnas.go.id/DetailOpac.aspx?id=651910#> (Accessed on July 27, 2021)
- Cappuccino, J.G. & Sherman, N. (2001) *Microbiology: A Laboratory Manual*. 6th Edition, Benjamin Cummings, San Francisco. ISBN: 9780805376487, pp: 466. <https://www.scirp.org/%28S%28351jmbn tvnsjt1aadkozje%29%29/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1702804> (Accessed on July 19, 2021)
- Dwidjosaputro. (2005). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Yogyakarta. ISBN: 979-428-605-2, Pp: 214. [http://otomasi.stikessatriabhakti.ac.id//index.php?p=show\\_detail&id=735](http://otomasi.stikessatriabhakti.ac.id//index.php?p=show_detail&id=735) (Accessed on July 19, 2021)
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist*, 125(1), 1–15. <http://www.jstor.org/stable/2461605>
- Hallmann, J. & Berg, G. (2006). Spectrum and Population Dynamics of Bacterial Root Endophytes. In: Schulz, B.J.E., Boyle, C.J.C., Sieber, T.N. (eds) *Microbial Root Endophytes*. Soil Biology, vol 9. *Springer, Berlin, Heidelberg*. [https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9\\_2](https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_2)
- Hallmann, J., Hallmann, A.Q. Miller, W.G. Sikora, R.A. & Lindow, S.E. (2001).

- Endophytic Colonization of Plants by the Biocontrol Agent *Rhizobium etli* G12 in Relation to *Meloidogyne incognita* Infection. *Phytopathology*: 415-422. <https://doi.org/10.1094/phyto.2001.91.4.415>
- Hemraj, V., Diksha, S. & Avneet, G. (2013). A Review on Commonly Used Biochemical test for Bacteria. Bhopal, India. *Innovare Journal of Live Science* 1: 1-7 <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijls/article/view/30>
- Herlina, L., Pukan, K.K. & Mustikaning. (2016). Kajian Bakteri Endofit Penghasil IAA (*Indol Acetic Acid*) Untuk Pertumbuhan Tanaman. *Saintekno* Vol. 14 No. 1: 51-58. <https://doi.org/10.15294/saintekno.v14i1.7616>
- Holt J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A, Staley, J.T & William, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott William and Wilkins, New York. <https://www.worldcat.org/title/bergeys-manual-of-determinative-bacteriology/oclc/28183643> (Accessed on July 27, 2021)
- Jukes, T.H. and Cantor, C.R. (1969) Evolution of Protein Molecules. In: Munro, H.N., Ed., *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York, 21-132. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4832-3211-9.50009-7>
- Kristiningrum, E. & Meymurti. (2012). Dahsyatnya Khasiat Herbal Untuk Hidup Sehat. Jakarta Timur: Dunia Sehat. ISBN: 978-602-19756-5-7, pp: 14.
- Kumar, A., Birnbaum, M., Patel, D. *et al.* Posttranslational arginylation enzyme Atel affects DNA mutagenesis by regulating stress response. *Cell Death Dis* 7, e2378 (2016). <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.284>
- Lehman, D. (2005). Triple Sugar Iron Agar Protocols. *American Society for Microbiology*: 1-7. <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Triple-Sugar-Iron-Agar-Protocols.pdf?ext=.pdf> (Accessed on July 20, 2021)
- Marchesi, J.R., Sato, T. Weightman, A.J, Martin T.A. Fry J.C. Hiom, S.J. Dymock, D. & Wade, W.G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 64(2):795-9. <https://doi.org/10.1128/aem.64.2.795-799.1998>
- Mukherjee, A., Rituparna, D. Arundhati, P. & Paul, A.K. (2017). Antibacterial Activity of Endophytic *Bacillus safensis* Isolate from *Ophioglossum reticulatum* L. *Microbiology Research Journal International* 18 (5): 1-12. <https://doi.org/10.9734/MRJI/2017/31923>
- Murugappan, R., Begum, S.B. & Roobia, R.R. (2013). Symbiotic influence of endophytic *Bacillus pumilus* on growth promotion and probiotic potential of the medicinal plant *Ocimum sanctum*. *Symbiosis*, 60 (2): 91-99. <https://doi.org/10.1007/s13199-013-0244-0>
- Mutschler, Ernst. (1991). *Dinamika Obat, Ed. 4*, terjemahan Widjianto, M.B, Setiadi, A.R. Penerbit ITB: Bandung. [http://digilib.ulm.ac.id/cabang/index.php?p=show\\_detail&id=26222](http://digilib.ulm.ac.id/cabang/index.php?p=show_detail&id=26222) (Accessed on July 19, 2021)
- Nasrun & Nurmansyah. (2015). Potensi Rizobakteria dan Fungisida Nabati Untuk Pengendalian Penyakit Jamur Akar Putih Tanaman Karet. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar* Vol. 2 No. 2: 61-68. <https://media.neliti.com/media/publications/140383-potency-of-rhizobacteria-and-botanical-f-b969a009.pdf> (Accessed on July 19, 2021)
- Oktaviani, R. F., Astuti, P., & Wahyukundari, M. A. (2022). Aktivitas antibakteri ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran*, 34(1), 66. <https://doi.org/10.24198/jkg.v34i1.34833>
- Nazhifah., Rustini. & Darwin, D. (2013). Uji Sensitivitas Isolat Bakteri dari Pasien Luka Bakar di Bangsal Luka Bakar RSUP DR.M.Jamil Padang. *Prosiding Seminar Nasional Sains Farmasi dan Klinik III Universitas Andalas*: 212-220. <https://adoc.pub/uji-sensitivitas-isolat-bakteri-dari-pasien-luka-bakar-di-ba.html> (Accessed on July 27, 2021)
- Resti Z., Habazar T, Putra, D.P. & Nasrun. (2013). Skring dan Identifikasi Isolat

- Bakteri Endofit Untuk Mengendalikan Penyakit Hawar Daun Bakteri pada Bawang Merah. *Jurnal HPT Tropika* Vol. 13, No. 2: 167-178. <https://doi.org/10.23960/j.hptt.213167-178>
- Sadihah, H. H., Cahyadi, A. I., & Windria, S. (2022). Kajian Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L) Sebagai Antibakteri. *Jurnal Sain Veteriner*, 40(2), 128. <https://doi.org/10.22146/jsv.58745>
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425. [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1774528](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1774528)
- Sardiani, N., Litaay, M. Budji, R.G. Priosambodo, D. & Dwyana, S.Z. (2015). Potensi Tunikata *Rhopalaea* sp. Sebagai Sumber Inokulum Bakteri Endosimbion Penghasil Antibakteri. *Jurnal alam dan lingkungan*, 6 (11): 1-10 <http://digilib.unhas.ac.id/opac/detail-opac?id=15269>
- Schulz, B.J.E., Boyle, C.J.C, & Sieber, T.N. 2006. Microbial Root Endophytes. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*: 1-367. <https://en.id1lib.org/book/1060531/a3fbf5> (Accessed on July 19, 2021)
- Sepriana, C., Sumiati, E. Jekti, DSD. & Zulkifli, L. (2020). Identifikasi dan Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Endofit Bunga Tanaman Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) Terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, 6(1):101-106. <https://doi.org/10.29303/jppipa.v6i1.340>
- Shafira, U.M. Pasaribu, F.H. & Bintang, M. (2014). Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle* L.) sebagai penghasil senyawa anti bakteri. *Current Biochemistry Volume 1 (1)*: 51-57 <https://journal.ipb.ac.id/index.php/cb/article/view/17890> (Accessed on July 19, 2021)
- Shield, P. & Cathcart, L. (2013). Motility test medium protocol. *American Society for Microbiology*: 1-10. <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Motility-Test-Medium-Protocol.pdf?ext=.pdf> (Accessed on July 20, 2021)
- Strobel, G. & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their natural Product. *Microbiology and Molecular Biology Review* 67: 491-502. <https://doi.org/10.1128%2FM5BR.67.4.491502.2003>
- Sudewo. (2005). *Sirih Merah*. <http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/22467/4/Chapter%20II.pdf>. (Accessed on July 19, 2021)
- Sunkar, S. & Nachiyar, C.V. (2012). Biogenesis of Antibacterial Silver Nanoparticles Using The Endophtic Bacterium *Bacillus cereus* from *Garcinia xanthochmus*. *Journal of Tropical Biomedicine* 2 (12): 953-959. [https://doi.org/10.1016%2F2221-1691\(13\)60006-4](https://doi.org/10.1016%2F2221-1691(13)60006-4)
- Syamsul & Prawiradilaga, D.M. (2013). *DNA Barcode Fauna Indonesia*. Jakarta: Prenada Media. Edisi Pertama. ISBN: 978-802-7985-26-1, pp: 240 <http://opac.kaltimprov.go.id/opac/detail-opac?id=65045> (Accessed on January 20, 2022)
- Toelle, N.N. & Lenda, V. (2014). Identifikasi dan Karakteristik *Staphylococcus* sp. dan *Streptococcus* sp. dari Infeksi Ovarium pada Ayam Petelur Komersial. *Jurnal Ilmu Ternak* Vol. 1. No. 7: 32-37. <https://jurnal.unpad.ac.id/jurnalilmu ternak/article/view/5145/2571>
- Wahyuni, S., Lianto. & Khaeruni, A. (2014). Isolasi Karakterisasi Bakteri Manolitikasal Bonggol Pohon Sagu. *Jurnal Agroteknos* Vol. 4. No. 3: 174-179. <http://ojs.uho.ac.id/index.php/agroteknos/article/view/223>
- Yu, H., Zhang, L. Li, L. Zheng, C. Gou, L. Li, W. Sun, P. & Qin, L. (2010). Recent Developments and Future Prospect of Antimicrobial Metabolites Produced by Endophytes. *Microbiol Res* 165: 437-449. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.009>
- Yulvizar, C. (2013). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik pada *Rastrelliger* sp. *Biospecies* Vol. 6 No. 2: 1-7. <https://online-journal.unja.ac.id/biospecies/article/view/884> (Accessed on January 20, 2022)

Zulkifli, L., Jekti, D.S.D. & Bahri, S. (2018).  
Isolasi, Karakteristik dan Identifikasi  
Bakteri Endofit Kulit Batang Srikaya  
(*Annosa squamosa*) dan Potensinya  
Sebagai Antibakteri. *Jurnal Penelitian  
Pendidikan IPA JPPIPA*: 21-29.  
<https://doi.org/10.29303/jppipa.v4i1.98>