



ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT DARI DAUN SIRIH HIJAU (*Piper betle* L.) DENGAN MENGGUNAKAN GEN 16S rRNA SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERINYA

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENDOFITING BACTERIES FROM GREEN SRIH LEAVES (*Piper betle* L.) BY USING 16S rRNA GENES AND TESTING THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Diza Sartika*¹, Irwandi¹, Ringga Novelni², Meysa Alena¹

¹Universitas Perintis Indonesia Fakultas Farmasi

²Universitas Negeri Padang

Email : dizasartika@gmail.com

ABSTRAK

Tanaman sirih hijau (*Piper betle* L.) sering dimanfaatkan secara tradisional karena kandungan metabolit sekundernya diyakini memiliki sifat antibakteri. Penelitian ini dilakukan untuk mengeksplorasi sifat dan potensi antibakteri dari bakteri endofit yang ada pada daun sirih hijau terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Penelitian menggunakan sampel daun sirih hijau yang berasal dari daun pucuk hijau (PH), daun muda hijau (MH), dan daun tua hijau (TH), serta menguji bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Metode Kirby-Bauer yang digunakan dalam uji aktivitas antibakterinya. Hasil identifikasi karakteristik bakteri endofit menunjukkan secara makroskopik bahwa mereka berbentuk bulat, permukaannya cenderung rata dengan sedikit lengkungan, serta berwarna putih bening hingga kekuningan. Sementara identifikasi mikroskopik dengan pewarnaan gram menunjukkan bahwa bakteri ini berbentuk basil dan termasuk dalam kelompok gram positif. Pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa PH (6,91 mm), MH (10,25 mm), dan TH (10,03 mm) menunjukkan aktivitas antibakteri yang lemah dan spesifik terhadap bakteri dengan cakupan yang terbatas. Namun, tidak ada aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*. Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat MH memiliki kemiripan sebesar 100% dengan ribosomal RNA dari *Bacillus siamensis* strain cqsM9. Dengan demikian, kesimpulan dari penelitian ini adalah terdapat tiga isolat murni bakteri endofit yang telah diuji untuk aktivitas antibakteri. Di antara isolat tersebut, isolat MH menonjol sebagai yang memiliki aktivitas antibakteri terbesar dan merupakan spesies dari *Bacillus siamensis*.

Kata kunci: Endofit ; antibakteri ; *Staphylococcus aureus* ; *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Piper betle L plant is a plant that is widely used as traditional medicine, because it contains secondary metabolites which are thought to have antibacterial activity. This study aimed to determine the characteristics and the amount of antibacterial activity produced by endophytic bacteria from *Piper betle* L against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria. The sample used in this research is *Piper betle* L taken green shoot leaves (PH), young green leaves (MH) and old green leaves (TH) and using the test bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The Kirby-Bauer method was used to test its antibacterial activity. The results on the characteristics of endohpytic bacteria from macroscopic morphological identification are round, raised flat, there are curves, clear white and yellowish white. The results of microscopic morphological identification by staining with gram PH, MH and TH were obtained by bacilli and gram positive. The results of antibacterial activity against the test *Staphylococcus aureus* bacteria such as PH (6.91 mm), MH (10.25 mm) and TH (10,03 mm) which are all classified as weak and

includes narrow-spectrum bacteria. Meanwhile, the test bacteria *Escherichia coli* did not have antibacterial activity. The results of molecular identification MH isolates had a 100% similarity with *Bacillus siamensis* strain *cqsM9* ribosomal RNA. In conclusion, there were 3 pure isolates of endophytic, the isolate that had the greatest antibacterial activity, such as MH isolate which is a species of *Bacillus siamensis*.

Keyword : Endofit ; antibakterisl ; *Staphylococcus aureus* ; *Escherichia coli*.

PENDAHULUAN

Sirih Hijau (*Piper betle* L.) banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional, sirih hijau (*Piper betle* L.) merupakan salah satu jenis tumbuhan terna memanjat yang termasuk famili Piperaceae, daun sirih hijau mengandung senyawa tannin yang bersifat antimikroba dan antijamur yang kuat dan dapat menghambat pertumbuhan beberapa jenis bakteri (Nadya M. Owu, Fatimawali, Meilani Jayanti, 2020). Daun Sirih hijau (*Piper betle* L) ini mengandung senyawa metabolit sekunder seperti saponin, tannin, flavonoid, terpenoid, polifenol, serta steroid yang diduga memiliki aktifitas sebagai antibakteri.

Dari hasil penelitian sebelumnya dilakukan oleh Ukhradiya, dkk (2014) menyatakan bahwa 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. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Soni Muhsinin, dkk (2019) menyatakan bahwa bakteri endofit dapat diisolasi dari tanaman daun sirih. Hasil uji antibakteri menggunakan mikrodilusi menghasilkan nilai KHM 1024 ppm untuk ID 1, ID 2 dan nilai KHM 16384 ppm untuk ID 7. Isolasi senyawa antibakteri dari bakteri maupun mikroba endofit dianggap lebih efisien dibandingkan dengan mengekstrak biomassa tanaman secara langsung (Kusumawati, *et al.*, 2014).

Kemampuan bakteri endofit menghasilkan senyawa aktif 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 (Purwanto, dkk, 2014).

Metode dalam identifikasi bakteri endofitnya menggunakan metode PCR, dimana dilihat dari berkembangnya identifikasi mikroorganisme saat ini maka identifikasi bakteri endofit dapat dilakukan dengan metode PCR dengan menggunakan gen 16S rRNA. PCR merupakan pengembangan lainnya dari PCR di mana proses amplifikasi dapat dipantau dengan melihat jumlah amplikon yang telah dihasilkan. Jumlah amplikon ini dapat terlihat dengan bantuan probe yang akan terintegrasi pada amplikon (Maddocks & Jenkins, 2016). Identifikasi berdasarkan sekuens gen 16S rRNA ini paling banyak digunakan untuk mengidentifikasi bakteri. Karena kecepatan analisis dan kepraktisannya, maka tidak mengherankan saat ini gen 16S rRNA banyak digunakan dalam berbagai bidang penelitian bakteriologi terutama untuk tujuan identifikasi (Akihary & Kolondam, 2020).

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti tertarik untuk mengisolasi bakteri endofit dari daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dan mengetahui uji aktivitas antibakteri yang dimilikinya, serta dilakukan identifikasi secara molekuler terhadap bakteri endofit yang memiliki aktivitas antibakteri terbesar dengan menggunakan gen 16S rRNA dengan alat PCR (Polimerase Chain Reaction) agar dapat



diketahui spesies dari bakteri endofit daun sirih hijau (*Piper betle* L.).

METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Februari sampai Juni 2022 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Perintis Indonesia dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang.

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 coloumn, termoblock, alat PCR dan alat elektroforesis.

Bahan

Daun sirih hijau (*Piper betle* L.), 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, N-hipoklorit 5.25%, disk kloramfenikol, lugol, larutan safranin, Primer 16S rRNA Forward (5' CCAGCAGCCGCGGTAATACG 3'), Primer 16S rRNA Reverse (3'-ATCGG (C/T) TACCTTGTTACGACTTC5'), gel red, DNA ladder 1 Kbp, loading dye, bubuk agarosa, dan TBE buffer.

Prosedur Kerja

1. Pengambilan dan Identifikasi Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun sirih hijau (*Piper betel* L.) dengan 3 kategori

yang berbeda yaitu pucuk daun, daun muda dan daun tua. Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dipilih berdasarkan ukuran, warna dan posisi daun. Daun pucuk memiliki warna daun hijau lebih muda dari pada daun muda, ukuran lebih kecil dari daun muda, posisinya ada di urutan paling atas. Daun muda memiliki warna daun hijau muda, ukuran lebih kecil dibandingkan daun tua, posisinya ada di urutan ke 1-4 dari pucuk daun. Daun tua dari daun sirih hijau (*Piper betle* L.) memiliki ukuran yang lebih lebar dibandingkan daun tua, warnanya hijau tua dan posisinya berada pada urutan ke 5 dan seterusnya (Mulangsri, 2018). Pengambilan sampel dilakukan di Lubuk Minturun, Kecamatan Koto Tengah, Kota Padang, Sumatra Barat. Sampel diidentifikasi di Herbarium Fakultas MIPA Universitas Andalas Padang.

2. Sterilisasi Alat dan Pembuatan Media

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan harus dicuci dan dikeringkan sebelum menjalani proses sterilisasi. Cawan Petri dilapisi dengan koran, sementara tabung reaksi dan pipet tetes ditutup menggunakan kapas sebelum dibungkus secara individual dengan kertas koran. Seluruh peralatan kemudian disterilkan dalam oven pada suhu 160oC selama 1 jam. Mulut Erlenmeyer ditutup dengan kapas, sementara gelas ukur ditutup dengan kapas dan dibungkus satu per satu menggunakan kertas koran sebelum menjalani proses sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121oC selama 15 menit dengan tekanan sebesar 15 lbs. Pinset, jarum ose, dan kaca objek disterilkan dengan cara dibakar menggunakan lampu spiritus.

b. Pembuatan Nutrient Agar

Nutrient Agar medium disiapkan dengan cara mencampurkan 20 gram Nutrient Agar ke dalam 1000 ml aquades steril di dalam erlenmeyer. Larutan ini kemudian dipanaskan di atas kompor sambil diaduk selama 10-15 menit, lalu menjalani proses

sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Retnowati, 2011).

3. Isolasi dan Purifikasi Bakteri Endofit Daun Sirih Hijau

Sampel daun dibersihkan dengan air mengalir hingga bersih, lalu dipotong menjadi segmen sekitar 1-3 cm masing-masingnya. Sterilisasi permukaan pada potongan sampel dilakukan secara bertahap: pertama direndam dalam etanol 96% selama 30 detik, kemudian dalam Na-hipoklorit 5.25% selama 30 detik, dan dibilas kembali dengan etanol 96% sebanyak tiga kali. Sampel yang telah disiapkan kemudian ditanam pada media Nutrient Agar untuk isolasi, diinkubasi, dan diamati sampai terbentuknya koloni bakteri. Koloni bakteri yang murni dipisahkan dengan cara mentransfer satu koloni ke dalam cawan petri yang berisi media Nutrient Agar baru, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah mendapatkan isolat bakteri yang murni, bakteri endofit dipindahkan ke agar miring Nutrient Agar (Kusumawati dkk, 2014).

4. Identifikasi Bakteri Endofit

a. Secara Makroskopis

Bentuk koloni (dilihat dari atas) : bulat, oval. Permukaan koloni (dilihat dari samping) : rata, timbul datar. Tepi koloni (dilihat dari atas) : lengkungan seperti gelombang dan menyebar. Warna koloni (pigmentasi) : Beberapa bakteri menghasilkan pigmen ketika mereka tumbuh di media misalnya : putih, putih kekuningan, atau kental seperti susu (Faradiska, 2012).

b. Secara Mikroskopis

Mikroskopis morfologi sel bakteri diobservasi melalui proses pewarnaan gram. Pertama-tama, 1-2 tetes aquades steril ditempatkan di kaca objek, diikuti dengan pengambilan satu ose koloni bakteri dari media yang diletakkan di atas aquades steril dan tersebar secara merata.

Olesan tersebut dibiarkan mengering dengan udara, dan setelah benar-benar kering, kaca objek tersebut dipanaskan beberapa kali di atas nyala api hingga terasa agak panas saat ditempelkan pada punggung tangan. Selanjutnya, dilakukan penjepitan dengan larutan kristal ungu (Gram A) dan dibiarkan selama satu menit sebelum dicuci menggunakan aquades dari botol semprot dan dikeringkan. Kemudian, ditetesi dengan larutan iodium (Gram B) dan dibiarkan selama 2 menit sebelum dicuci kembali menggunakan aquades dari botol semprot dan dikeringkan. Langkah berikutnya adalah penjepitan dengan larutan etanol 96% (Gram C) selama 30 detik, dicuci kembali menggunakan aquades dari botol semprot dan dikeringkan. Setelah itu, ditetesi dengan larutan safranin (Gram D) atau zat penutup dan dibiarkan selama 30 detik sebelum dicuci menggunakan aquades dari botol semprot dan dikeringkan. Selanjutnya, sampel diamati menggunakan mikroskop pada pembesaran kuat untuk analisis lebih lanjut (Waluyo, 2010).

5. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Pembuatan Larutan Mac Farland 0,5

Sebanyak 10 ml larutan H₂SO₄ 1% dicampur dengan 0,05 ml larutan BaCl₂·2H₂O 1,175% dalam erlenmeyer. Larutan tersebut kemudian dikocok hingga terjadi kekeruhan dalam larutan. Kekeruhan ini digunakan sebagai standar kekeruhan untuk suspensi bakteri yang diuji (Sihombing dkk, 2018).

b. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri uji, seperti *Escherichia coli* yang merupakan bakteri gram negatif, dan *Staphylococcus aureus* yang merupakan bakteri gram positif, diambil sekitar ± 1 ose dan kemudian disuspensikan dalam tabung yang berisi 5 mL larutan NaCl 0,9% hingga

mencapai tingkat kekeruhan yang setara dengan standar kekeruhan larutan MacFarland 0,5. Suspensi bakteri tersebut kemudian diambil sebanyak 200 μ L menggunakan pipet dan disebar ke media pembedihan (Sihombing dkk, 2018).

- c. **Penyiapan Bakteri Endofit**
Bakteri endofit yang diisolasi dari setiap sampel diambil menggunakan jarum ose, lalu diinokulasikan ke dalam 9 ml larutan NaCl 0,9%, dan diaduk secara intensif dengan vortex sampai homogen.
- d. **Pengujian Aktivitas Antibakteri**
Sebanyak 200 μ L suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* ditempatkan secara merata di atas permukaan media Mueller Hinton Agar. Permukaan media ini kemudian diberi tiga kertas cakram yang dijepit suspensi isolat bakteri endofit dari pucuk daun, daun muda, daun tua, serta cakram kloramfenikol sebagai kontrol positif. Setelah itu, media diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator selama 24 jam, dan pengujian ini diulang sebanyak 3 kali.
- e. **Pengamatan dan Pengukuran Zona Hambat**
Observasi dilakukan setelah inkubasi selama 1 x 24 jam. Zona transparan yang muncul di sekitar kertas cakram diamati dengan cermat. Diameter zona transparan ini diukur menggunakan alat pengukur jangka sorong, mengikuti klasifikasi CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). CLSI membaginya ke dalam tiga kategori: sensitif, intermediet, dan resisten. Sensitifitas bakteri terhadap antibiotik diindikasikan dengan adanya zona transparan yang jelas saat pengujian (responsif terhadap antibiotik), kategori intermediet mengisyaratkan bahwa bakteri

terhambat tetapi dengan tingkat kepekaan yang lebih rendah, sementara kategori resisten menunjukkan hambatan yang sangat minim atau bahkan tidak ada sama sekali saat uji dilakukan.

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. Identifikas Bakteri Endofit Secara Molekuler

a. Isolasi DNA

Isolat bakteri endofit yang menunjukkan aktivitas antibakteri terbesar di medium miring diambil menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam tabung microtube yang berisi Phosphate Buffered Saline (PBS) sebanyak 1 ml. Kemudian, sampel dalam tabung microtube disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifugasi, supernatan dibuang dan ditambahkan 1 ml TE buffer, diikuti dengan pengadukan intensif menggunakan vortex. Selanjutnya, sampel diinkubasi pada heating block selama 10 menit dengan suhu 95°C, kemudian suspensi bakteri tersebut disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Supernatan kemudian dipindahkan ke dalam tabung microtube berukuran 1,5 ml dan disimpan dalam freezer (Sihombing dkk, 2018).

b. Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan PCR

DNA yang telah diisolasi akan melalui proses PCR yang terdiri dari tiga langkah: denaturasi, anealing, dan extension, sebagaimana yang dijelaskan pada tabel 4, menggunakan primer 16S rRNA (Rahmani, dkk, 2006). Amplifikasi

DNA ini menggunakan Taq DNA Polymerase dengan 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 ($^{\circ}\text{C}$)	Waktu (menit)
1	95	3 menit
35	95(denaturasi) 55(annealing) 72(extension)	30 detik 30 detik 30 detik
1	F extension 72	5 menit
1	Cooling 12	Sampai selesai

7. Elektroforesis Gel Agarosa dan Visualisasi

Larutan gel agarosa 0,2% disiapkan dengan melarutkan 0,2 gram bubuk agarosa dalam 20 ml TE buffer. Larutan ini kemudian dipanaskan menggunakan microwave selama 1-2 menit sampai larut dengan baik dan berwarna bening. Setelah itu, ditambahkan 3 μL gel red ke dalam larutan tersebut dan dituangkan ke dalam cetakan Casting tray yang telah dilengkapi dengan sisir. Setelah gel mengeras dalam waktu sekitar 30 menit, sampel produk amplicon PCR sebanyak 5 μL dimasukkan ke dalam gel. Untuk menentukan ukuran produk amplifikasi PCR, 3 μL DNA ladder 1Kbp dan 3 μL loading dye dimasukkan ke dalam sumuran gel pertama, diikuti oleh sampel DNA hasil amplifikasi pada sumuran gel berikutnya. Selanjutnya, elektroda dihubungkan dengan power supply dan dinyalakan selama 40 menit. Setelah itu,

alat elektroforesis dimatikan dan gel diambil dari alatnya, kemudian ditempatkan di dalam UV-transiluminator untuk visualisasi, pengamatan, dan dokumentasi hasilnya (Sihombing dkk, 2018).

8. Analisis Data

Analisis ini memanfaatkan pendekatan eksperimental dan deskriptif, terutama melalui hasil isolasi dan identifikasi bakteri menggunakan teknik molekuler berdasarkan rRNA dengan metode PCR. Semua data berasal dari pengumpulan, pengamatan langsung, dan dokumentasi selama proses penelitian, yang menjadi dasar bukti untuk analisis.

HASIL

Penelitian yang telah dilaksanakan didapatkan hasil identifikasi morfologi bakteri endofit secara makroskopis yaitu isolat dari daun pucuk hijau dengan kode PH didapatkan bentuk bulat, timbul datar, terdapat lengkungan, putih bening. Isolat dari daun muda hijau dengan kode MH didapatkan bentuk bulat, timbul datar, terdapat lengkungan, putih kekuningan. Isolat dari daun tua hijau dengan kode TH didapatkan bentuk bulat, timbul datar, terdapat lengkungan, putih bening. Selanjutnya secara mikroskopis yaitu isolat PH didapatkan bentuk basil yang termasuk gram positif, isolat MH didapatkan bentuk basil yang termasuk gram positif, isolat TH didapatkan bentuk basil yang termasuk gram positif.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari bakteri endofit yang berasal dari daun sirih hijau (*Piper betle* L.) terhadap *Escherichia coli* dilakukan menggunakan metode difusi agar, yang menunjukkan zona tidak memiliki diameter (0 mm), artinya tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Kontrol positif (Kloramfenikol) menunjukkan rata-rata diameter zona bening antibakteri sebesar 15,45 mm. Sementara pada pengujian terhadap *Staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi agar, isolat PH menunjukkan rata-rata

diameter zona bening antibakteri sebesar 6,91 mm. Isolat MH menunjukkan rata-rata diameter zona bening antibakteri sebesar 10,25 mm, sedangkan isolat TH menunjukkan rata-rata diameter zona bening antibakteri sebesar 10,03 mm. Kontrol positif (Kloramfenikol) pada bakteri tersebut menunjukkan rata-rata diameter zona bening antibakteri sebesar 20,35 mm.

Hasil dari PCR menunjukkan DNA yang sudah diperbanyak dan setelah dielektroforesis terlihat adanya pita yang sejajar dengan marker sekitar 1.300 bp. Analisis lengkap hasil sekuensing Gen 16S rRNA dilakukan di CV. Crow Bioteknologi, sementara hasil sekuensing DNA dianalisis menggunakan metode BLAST melalui National Center for Biotechnology Information (NCBI) secara daring. Hasilnya menunjukkan bahwa isolat MH memiliki tingkat kesamaan nukleotida yang mencapai 100% dengan database BLAST, serta sekuens yang cocok sebesar 100% dengan Bacillus siamensis strain cqsM9 16S ribosomal RNA.

PEMBAHASAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk memahami sifat dan aktivitas antibakteri yang diproduksi oleh bakteri endofit yang berasal dari daun sirih hijau (*Piper betle* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari daun sirih (*Piper betle* L.) yang dikumpulkan di Lubuk Minturun, Koto Tengah, Padang, Sumatera Barat, kemudian diidentifikasi di Herbarium ANDA dengan No Identifikasi: 489/K-ID/ANDA/XI/2021. Identifikasi ini dilakukan untuk memastikan bahwa tumbuhan yang digunakan adalah sirih hijau (*Piper betle* L.) yang sama. Sampel daun sirih hijau ini teridentifikasi sebagai spesies *Piper betle* L. Bagian sampel yang diambil termasuk pucuk daun (PH), daun muda (MH), dan daun tua (TH), untuk menentukan daun yang menghasilkan bakteri endofit yang memiliki kandungan senyawa antibakteri terbesar.

Dilakukan sterilisasi permukaan terhadap ke tiga sampel yang digunakan,

kemudian diinkubasi di media *Nutrient Agar* (NA) dalam cawan petri. Setelah itu dilakukan pemurnian koloni terhadap bakteri yang telah tumbuh pada media NA, kemudian dilakukan identifikasi morfologi bakteri endofit secara makroskopik. Berikut hasil pengamatan morfologi secara makroskopik bakteri endofit :

Tabel 4. Hasil Pengamatan Morfologi Makroskopik Bakteri Endofit

Identifikasi Makroskopik	Hasil Pengamatan		
	PH	MH	TH
Bentuk	Bulat	Bulat	Bulat
Permukaan	Timbul datar	Timbul datar	Timbul datar
Tepi	Lengkungan	Lengkungan	Putih kekuningan
Warna	Putih bening	Lengkungan	Putih bening

Keterangan : PH = Pucuk Hijau, MH = Merah Hijau, TH = Tua Hijau

Berdasarkan tabel tersebut, terlihat bahwa bakteri endofit memiliki ciri-ciri seperti bentuk bulat, permukaan cenderung rata, dengan sedikit lengkungan, dan memiliki warna putih bening hingga kekuningan. Temuan ini konsisten dengan deskripsi Faradiska (2012) mengenai karakteristik koloni bakteri endofit, yang sering kali memiliki bentuk bulat atau oval, dengan koloni berwarna putih, kekuningan, atau memiliki tekstur kental seperti susu, serta ciri-ciri tepian koloni yang memiliki lekukan mirip gelombang dan tersebar.

Setelah itu, isolat tersebut diuji secara mikroskopis dengan menggunakan pewarnaan gram untuk mengidentifikasinya. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semua bakteri endofit dalam isolat tersebut adalah bakteri gram positif. Hal ini terlihat dari koloni berwarna ungu dan berbentuk basil pada hasil pengamatan pewarnaan gram terhadap bakteri endofit.

Tabel 5. Hasil Pengamatan Bakteri Endofit Berdasarkan Pewarnaan Gram

Kode Isolat	Pewarnaan Gram	Bentuk
PH	Positif	Basil
MH	Positif	Basil
TH	Positif	Basil

Keterangan : PH = Pucuk Hijau, MH = Merah Hijau, TH = Tua Hijau

Berdasarkan tabel tersebut, dapat disimpulkan bahwa isolat PH, MH, dan TH semuanya menunjukkan hasil gram positif dengan bentuk basil. Bakteri gram positif ini dapat diidentifikasi dengan koloni ungu karena kemampuannya mempertahankan pewarnaan kristal violet dalam metode pewarnaan Gram. Dinding sel bakteri gram positif terdiri dari peptidoglikan yang tebal, mampu menahan zat warna dan tidak terpengaruh saat dicuci dengan alkohol, sehingga warna ungu tetap terlihat saat diamati. Struktur dinding sel bakteri gram positif ini relatif lebih sederhana daripada bakteri gram negatif yang memiliki lapisan lipid yang lebih banyak, yang menyebabkan pewarnaan gram kurang efektif karena alkohol merusak lapisan lipid dan mampu menghilangkan kristal violet yang diserap sebelumnya, membuat bakteri berwarna merah setelah pemberian safranin. Bakteri endofit lebih banyak terdapat pada bakteri gram positif karena memiliki kandungan lipid yang lebih rendah, sekitar 1-4%, dibandingkan dengan bakteri gram negatif yang memiliki kandungan lipid sekitar 11-12%. Bakteri gram positif juga hanya memiliki satu lapisan membran peptidoglikan yang tebal, yang lebih mudah larut dalam etanol.

Selanjutnya, dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dari isolat bakteri endofit untuk mengevaluasi kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Pengujian ini menggunakan metode difusi agar terhadap dua jenis bakteri, yaitu *Staphylococcus aureus* (bakteri gram positif) dan *Escherichia coli* (bakteri gram negatif). Kedua bakteri ini merupakan penyebab umum dari infeksi pada manusia. *Staphylococcus aureus* merupakan bagian dari flora normal pada tubuh manusia,

sementara *Escherichia coli* merupakan bagian dari flora normal pada saluran pencernaan. Namun, dalam kondisi tertentu, *Escherichia coli* dapat menyebabkan infeksi usus yang ditandai dengan gejala diare karena kemampuannya merusak sel mukosa, memproduksi toksin yang memengaruhi sekresi cairan di usus, dan meningkatkan kemampuan menempel pada jaringan. Selain itu, *Escherichia coli* juga dapat menyebabkan penyakit seperti infeksi saluran kemih (ISK), sepsis, dan meningitis (Brooks, 2001).

Kemudian, aktivitas antibakteri diuji pada tiga isolat bakteri endofit yaitu PH, MH, dan TH, yang diujikan terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan metode difusi kertas cakram pada Mueller Hinton Agar (MHA). Berikut adalah hasil pengujian aktivitas antibakteri dari bakteri endofit yang berasal dari daun sirih hijau (*Piper betle* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

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

Kode isolat/ Kontrol	Diameter Zona Bening (mm)					
	<i>Staphylococcus aureus</i>			Rata-rata	<i>E.coli</i>	
	Pengulangan				Pengu-langan	Rata-rata
	1	2	3	1		
PH	10,40	10,35	0	6,91	0	0
MH	10,45	10,15	10,15	10,25	0	0
TH	10,80	9,15	10,15	10,03	0	0
Kloramfenikol (Kontrol Positif)	20,33			20,33	15,45	15,45

Berdasarkan tabel diatas dapat dilihat dari hasil pengukuran rata-rata diameter zona bening yang didapatkan, daya antibakteri terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* dari isolat PH yaitu 6,91 mm, MH 10,25 mm, dan TH 10,03 mm. Sedangkan daya antibakteri terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dari isolat PH, MH, dan TH adalah 0.00 mm, sehingga isolat bakteri endofit termasuk kategori lemah.

Menurut Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI), respon hambatan



lemah ketika diameter zona hambat antibakteri \leq 14 mm, respon hambatan sedang ketika diameter zona hambat antibakteri 15-18 mm, respon hambatan kuat ketika diameter zona hambat antibakteri \geq 19 mm. Maka pada isolat bakteri endofit dapat menghambat bakteri uji *Staphylococcus aureus*, dan tidak dapat menghambat bakteri uji *Escherichia coli*. Sehingga isolat bakteri endofit termasuk bakteri berspektrum sempit.

Hal ini menunjukkan bahwa daun sirih hijau (*Piper betle* L.) mengandung zat antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* walaupun daya hambatnya tergolong lemah. Berdasarkan penelitian Purwanto (2014) menyatakan bahwa terbentuknya daerah bening pada bagian akar dan batang sirih hijau, dikarenakan akar merupakan bagian utama dimana bakteri endofit masuk ke dalam jaringan tanaman. Sedangkan pada daun sirih hijau tidak terbentuknya daerah bening. Terbentuknya daerah bening menunjukkan bahwa bakteri endofit tersebut menghasilkan senyawa bioaktif seperti senyawa saponin, tannin, flavonoid, terpenoid, polifenol, serta steroid yang mampu digunakan sebagai antibakteri (Tan & Zou, 2001).

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*, hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri isolat daun sirih hijau (*Piper betle* L.) lebih efektif. Bakteri gram positif memiliki struktur gram dinding sel dengan lebih banyak peptidoglikan, sedikit lipid dan dinding sel mengandung polisakarida (asam teikoat). Asam teikoat merupakan polimer yang larut dalam air, yang berfungsi sebagai transport ion positif untuk keluar atau masuk. Karena sifat larut air inilah yang menunjukkan bahwa dinding sel

bakteri gram positif bersifat lebih polar. Senyawa flavonoid dan tanin merupakan bagian yang bersifat polar sehingga lebih mudah menembus lapisan peptidoglikan yang bersifat polar dari pada lapisan lipid yang non polar. Hal tersebut menyebabkan aktivitas penghambatan pada bakteri gram positif lebih besar dari pada bakteri gram negatif. Karena struktur dinding sel yang menyebabkan kedua jenis bakteri tersebut memberikan respon yang berbeda sehingga menunjukkan bakteri dengan isolat MH memiliki nilai perhitungan rata-rata diameter zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan isolat PH, dan TH. Sehingga isolat bakteri endofit MH akan dilanjutkan untuk identifikasi molekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA untuk mengetahui jenis bakteri tersebut.

Kemudian, isolat bakteri dari MH yang menunjukkan daya hambat paling besar diidentifikasi melalui analisis molekuler menggunakan gen 16S rRNA untuk mengidentifikasi jenis bakterinya. Proses identifikasi molekuler mikroorganisme melibatkan empat tahap utama, yaitu isolasi DNA, PCR, elektroforesis, dan sekuensing. Proses isolasi DNA menggunakan metode pemanasan (boiling) yang merupakan pendekatan sederhana dengan memberikan perlakuan fisik pada sel bakteri melalui pemanasan pada suhu tinggi (950-1000C). Pemanasan pada suhu tinggi memungkinkan permeabilitas yang lebih tinggi pada dinding sel, memungkinkan cairan dan molekul di sekitar sel masuk dan zat-zat dari dalam sel keluar. DNA kemudian diisolasi untuk digunakan sebagai materi genetik dalam proses PCR selanjutnya (Afif, 2019).

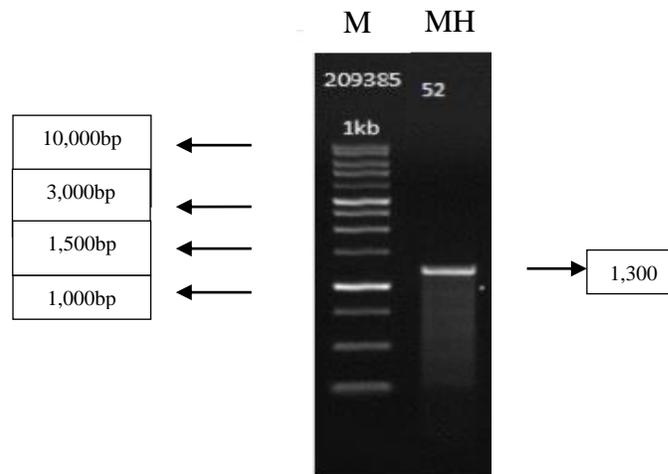
Setelah itu, DNA yang diekstraksi akan diperbanyak melalui metode PCR dengan menggunakan primer universal dari gen 16S rRNA. Tahap perbanyakan melalui PCR menyebabkan pemisahan untai DNA (denaturasi) pada pita DNA, di mana DNA template terpisah menjadi untai tunggal. Bahan yang digunakan mencakup H₂O, Taq Master mix, primer forward (338F), dan primer reverse (1525R). Taq Master mix berperan sebagai

campuran komponen DNA template yang akan diperbanyak menggunakan mesin PCR. Primer Forward berfungsi sebagai inisiator sintesis untai DNA dari ujung 5' ke 3', sementara Primer Reverse bertugas memulai sintesis untai DNA dari ujung 3' ke 5'. Peran DNA template dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang identik (Harvianti, 2017).

Tahap berikutnya yaitu elektroforesis DNA yang merupakan suatu teknik yang mengukur laju perpindahan partikel-partikel

bermuatan dalam suatu medan listrik (Gaffar, 2007). Teknik ini dapat digunakan untuk memanfaatkan muatan listrik yang ada pada molekul misalnya DNA yang bersifat negatif. Molekul yang dapat dipisahkan antara lain DNA, RNA, atau protein. Jika suatu molekul yang bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium, misalnya gel agarosa, kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif (Yuwono, T., 2005).

Hasil dari elektrofoteris dari isolat MH :



Gambar 1. Hasil Elektroforesis dari Produk Amplifikasi Gen 16S rRNA isolat bakteri endofit daun muda hijau (MH) dengan ukuran pita DNA ± 1300 bp. M (DNA marker) 1 kb DNA ladder.

Berdasarkan gambar diatas dapat dilihat bahwa setelah hasil dari proses amplifikasi divisualisasikan pada elektroforesis, maka hasil dari elektroforesis isolat dengan kode MH terdapat pita, diketahui terseparasi dan sejajar dengan marker 1300 bp. Dapat dilihat pada gambar bahwa panjang M (DNA marker) sebesar 1kb ditandai dengan terangnya 1000 bp dan 3000 bp sebagai DNA ladder.

Hal ini mengindikasikan bahwa fragmen gen yang teramplifikasi memiliki ukuran ± 1300 bp yang sesuai dengan ukuran nukelotida dari gen 16S rRNA yaitu sekitar 1500 bp, sehingga

dapat disimpulkan bahwa proses amplifikasi bakteri berhasil dilakukan. Keberhasilan teknik PCR ini didasari dengan kecocokan primer dengan isolat yang akan digunakan serta optimasi selama proses PCR (Rinanda, 2011).

Selanjutnya isolat dideterminasi dengan menggunakan sekuen 16S rRNA yang dianalisis secara lengkap di 1st BASE Singapura melalui CV. Crow Bioteknologi. Pada sekuen tersebut dilakukan dengan program BLAST-N (*Basic Local Alignment Search Tool-Nukelotida*).

Berikut hasil dari analisis BLAST dari isolat MH seperti pada gambar berikut :

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100			
select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus siamensis strain cqsM9_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus siamensis	2015	2015	100%	0.0	100.00%	1500	MN826567.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus amyloliquefaciens strain R8-25 chromosome, complete genome	Bacillus amyloliqu...	2015	18107	100%	0.0	100.00%	4010543	CP054479.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus amyloliquefaciens strain R8-25 plasmid unnamed1, complete sequence	Bacillus amyloliqu...	2015	2015	100%	0.0	100.00%	5685	CP054478.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus velezensis strain B268 chromosome, complete genome	Bacillus velezensis	2015	18125	100%	0.0	100.00%	3908940	CP053764.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus velezensis strain EN01 chromosome, complete genome	Bacillus velezensis	2015	18109	100%	0.0	100.00%	4029600	CP053377.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus amyloliquefaciens strain WF02 chromosome, complete genome	Bacillus amyloliqu...	2015	18142	100%	0.0	100.00%	4026648	CP053376.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus amyloliquefaciens HCM6-1 gene for 16S rRNA, partial sequence	Bacillus amyloliqu...	2015	2015	100%	0.0	100.00%	1448	LC543397.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus velezensis strain UCMB5140 chromosome, complete genome	Bacillus velezensis	2015	18765	100%	0.0	100.00%	3980571	CP051463.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus siamensis strain PFAA33_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus siamensis	2015	2015	100%	0.0	100.00%	1487	MT353854.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus sp. HNA3 chromosome, complete genome	Bacillus sp. HNA3	2015	18042	100%	0.0	100.00%	3929648	CP040881.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus sp. (in: Bacteria) strain 21074_1_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: Ba...	2015	2015	100%	0.0	100.00%	1494	MT330386.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus sp. (in: Bacteria) strain 20713_1_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: Ba...	2015	2015	100%	0.0	100.00%	1480	MT330385.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus velezensis strain BY6 chromosome, complete genome	Bacillus velezensis	2015	18114	100%	0.0	100.00%	3898273	CP051011.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus velezensis B2-9 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	Bacillus velezensis	2015	2015	100%	0.0	100.00%	1476	LC537275.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus velezensis strain Hto6 chromosome, complete genome	Bacillus velezensis	2015	2348	100%	0.0	100.00%	3889281	CP050462.1

Gambar 2. Hasil Analisis BLAST dari Isolat Bakteri Endofit MH

Berdasarkan gambar diatas dapat dilihat bahwa 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. Analisis BLAST ini dilakukan dengan tujuan membandingkan hasil yang diperoleh dengan hasil sekuen DNA dari seluruh dunia yang didepositkan pada database Gen Bank.

Setelah sekuens sampel dengan kode MH 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 isolat MH yaitu *Bacillus siamensis* strain cqsM9 16S rRNA. Dimana isolat MH memiliki tingkat kesamaan panjang nukleotida pada database di BLAST mencapai 100 % dan memiliki kecocokan sekuens mencapai 100 % dengan hal ini *Bacillus siamensis* strain cqsM9 rRNA.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Terdapat 3 isolat bakteri endofit yang berhasil diisolasi dari daun sirih hijau (*Piper betle* L.) daun pucuk hijau (PH), daun muda hijau (MH) dan daun tua hijau (TH). Didapatkan karakteristik bakteri endofit hasil identifikasi morfologi secara makroskopik yaitu bulat, timbul datar, terdapat lengkungan, putih bening dan putih kekuningan. Sedangkan hasil identifikasi morfologi secara mikroskopik dengan cara pewarnaan gram yaitu berbentuk basil dan termasuk gram positif. Dan hasil identifikasi molekuler isolat secara molekuler memiliki kecocokan 100 % dengan *Bacillus siamensis*. Isolat bakteri endofit dari daun sirih hijau (*Piper betle* L.) menunjukkan adanya kemampuan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan daya hambat terbesar yaitu 10,25 mm yang tergolong lemah dan termasuk bakteri yang berspektrum sempit.

Saran

Disarankan untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk identifikasi serta purifikasi senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri daun sirih hijau



dengan menggunakan bakteri uji yang berbeda untuk uji aktivitas antibakteri serta dengan metode yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Afif, R. 2019. *16S rRNA Gene Amplification Of Endophytic Bacteria Which Produces Antimicrobial Compounds*. Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences : Universitas Negeri Padang.
- Ahyar, A. 2014. *Buku Ajar Bioteknologi Dasar*. Jurusan Kimia. Universitas Hasanuddin: Makassar.
- Akihary, C. V., & Kolondam, B. J. 2020. Pemanfaatan gen 16S RNAa sebagai perangkat identifikasi bakteri untuk penelitian-penelitian di Indonesia. *Pharmacol*, 9(1), 16–22.
- 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.
- Ferianto, A. 2012. *Pola Resistensi Staphylococcus aureus yang Diisolasi dari Mastitis pada Sapi Perah di Wilayah Kerja KUD Argopuro Krucil Probolinggo Terhadap Antibiotika* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Gaffar, S. 2007. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*. Bandung : Universitas Padjajaran.
- Harvianti, Y. 2017. *Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Penghasil Fitase Asal Tanaman Jagung Zea Mays L.) Berbasis Gen 16S rRNA*. Skripsi. Fakultas Sains Dan Teknologi Uin Alauddin. Makassar. Kusumawati, D. E., Fachriyan, H. Pasaribu., dan Maria, B. 2014. Aktivitas antibakteri isolat bakteri endofit dari tanaman miana (Coleus Scutellarioides [L.] Benth.) terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. *Current Biochemistry, 1 (1)*, 45-50.
- Muhsinin S, Parida I, Rum IA, Kusnadi. 2019. Isolasi Bakteri Endofit dari Daun Sirih Hijau (Piper betle L) Sebagai Antibakteri Terhadap Staphylococcus. http://ejurnal.stikes-bth.ac.id/index.php/P3M_JoP
- Mulangnsri, DAK. 2018. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Muda dan Daun Tua Sirih Hijau (Piper betle L.) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus*. Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim, Semarang.
- Owu NM, Fatimawali, Jayanti M. 2020. Uji Efektivitas Penghambatan Dari Ekstrak Daun Sirih (Piper betle L.) Terhadap Bakteri streptococcus mutans. <https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/biomedik/index>
- Purwanto UMS, Pasaribu FH, Bintang M. 2014. *Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Sirih Hijau (Piper betle L.) dan Potensinya sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri*. Institut Pertanian Bogor : Bogor.
- Rinanda, Tristia. 2011. Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*.
- Sepriana, C., Jekti, D. S. D., 2017. Bakteri Endofit Kulit Batang Tanaman Cengkeh (Syzygium Aromaticum L.) Dan Kemampuannya Sebagai Antibakteri. *Jurnal Penelitian Pendidikan Ipa*, 3(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.
- Tan, R.X., Zou, W.X., 2001. Endophytes: *arich source of functional metabolites*
- Waluyo, L. 2010. *Teknik Metode Dasar Mikrobiologi*. UMM Press. Malang.
- Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. Jakarta. Erlangga.